EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores: P. Huber, Basel · R. Matthey, Lausanne · A. v. Muralt, Bern · L. Ruzicka, Zürich

Redactor: H. Mislin, Basel · Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL (SCHWEIZ)

SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS

Articles généraux – Übersichtsreferate
Articoli riassuntivi – Surveys

M. Brenner, A. Niederwieser und G. Pataki: Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäurederivaten auf Kieselgel G. N-(2,4-Dinitrophenyl)-Aminosäuren und 3-Phenyl-2-thiohydantoine 145

E. Kovács: Cell Metabolism and Virus 153

Brèves communications – Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni – Brief Reports

H. L. Slates and N. L. Wendler: Retroaldol Transformations in the Westphalen Diol Series 161

K. Macek: Papierchromatographie-Beitrag zur Bestimmung der C_3-Konfiguration bei Reserpoiden 162

C. Djerassi, B. Gilbert, J. N. Shoolery, L. F. Johnson, and K. Biemann: Alkaloid Studies XXVI. The Constitution of Pyrifolidine 162

P. Pudlák, Irena Stará, and Erika Deimlová: Activation by Contact with Glass and the Action of Thrombin 164

Th. Mester: Versuche zur Isolierung der γ-Globuline aus Kaninchenserum durch Acetonfällung 165

R. A. Messing: Pinguinain: Comparison of Cuban, Puerto Rican and the Thermal Properties 167

G. Cognetti: Endomeiosis in Parthenogenetic Lines of Aphids 168

J. Arpai: Kälteeinfluss und Peptidase-Aktivität von Bakterien 170

Kimiyo Takeuchi: Amino Acids in the Endosperms of *Palmae* in Amazon 171

H. F. Hoenigsberg, E. Gallucci, and A. Giavelli: The Oxygen Effect in Irradiated Mature and Meiotic Germ Cells of *Drosophila melanogaster* 172

B. D. Sanwal and E. R. Waygood: The Effect of Fusaric Acid on the Oxidative Phosphorylation of Plant Mitochondria . . . 174

S. W. Bowne Jr.: A Biochemical Mechanism for the Production of Abnormal Tetrad Ratios 175

P. S. Chen and Ch. Zeller: Changes in DNA and RNA during Embryonic Development of the Merogonic Combination *Triton palmatus* (♀) × *Triton cristatus* (♂) 177

K. Sander: Umkehr der Keimstreifpolarität in Eifragmenten von *Euscelis* (Cicadina) 179

J. Babel et C. Avanza: Dégénérescence rétinienne expérimentale provoquée par le fluorure de sodium 180

F. Vella: The Incidence of Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Singapore 181

K. Ostrowski, J. Komender, and K. Kwarecki: Quantitative Investigations on the Solubility of Proteins Extracted from Tissues Fixed by Different Chemical and Physical Methods . . . 183

A. Stolk: Histochemical Analysis of Three Dehydrogenase Systems in the Renal Adenocarcinoma of the Frog *Rana pipiens* 184

W. Thorsell und E. Lienert: Die papierelektrophoretische Auftrennung von Phosphoarginin und Arginin 185

H. Bornschein und Katharine Tansley: Elektroretinogramm und Netzhautstruktur der Sumpfohreule (*Asio flammeus*) . . . 185

H. W. Haag, A. Philippu und H. J. Schümann: Freisetzung von Brenzcatechinaminen aus der isoliert durchströmten Nebenniere durch Tyramin und β-Phenyläthylamin 187

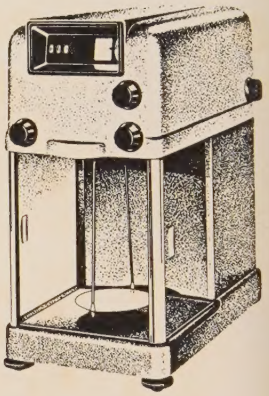
E. Curio: Rassenspezifisches Verhalten gegen einen Raubfeind 188

L. H. Tunstall and L. H. Mattman: Growth of Hemolytic Streptococci in Vitamin Free Medium (Pro Experimentis) . . . 190

F. Dittrich: De l'opportunité de quelques équations différentielles en vestibulométrie (Disputandum) 191

E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich

Garantierte
Genauigkeit
Konstante
Empfindlichkeit
Bessere
Reproduzierbarkeit



M 1

Liste des annonceurs – Verzeichnis der Inserenten – Elenco degli inserzionisti – List of Advertisers – Experientia XVII/4

Bios Laboratories, Inc., New York
CIBA Aktiengesellschaft, Basel
Ganz Optar AG, Zürich
J. R. Geigy AG, Basel
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel
Lonza AG, Basel
E. Mettler, Zürich
Pfizer Group, U.S.A.
Regis Chemical Company, Chicago
Sandoz AG, Basel

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an frs. 74.–. Ce prix s'entend en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt Fr. 74.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può essere richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 74.–. Il prezzo è inteso in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription is sFr. 74.–. Price in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1961 Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Telephon (061) 23 18 10; Telegrammadresse: Edita Basel*

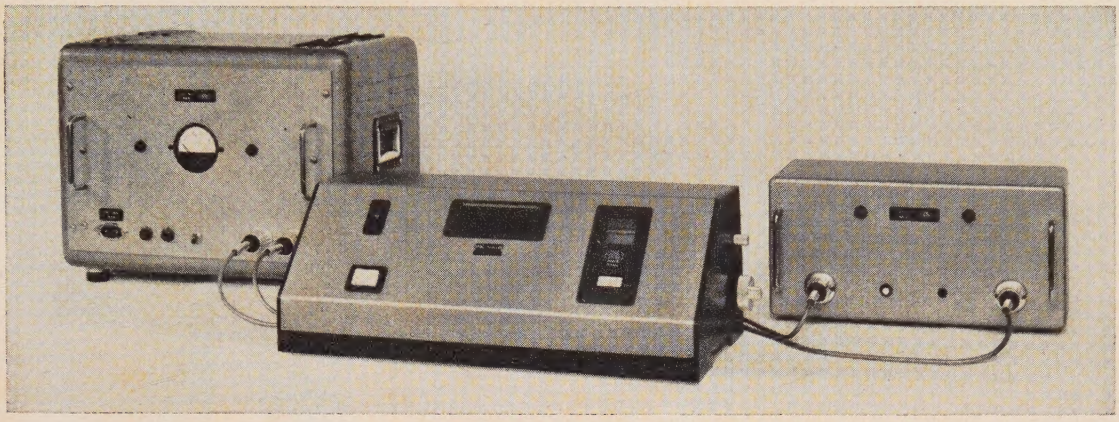
Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

ZEISS

Lichtelektrisches Präzisionspolarimeter 0,005°

Besondere Merkmale:

- Hohe Meßgenauigkeit
- Frei von persönlichen Einstellfehlern und frei von Parallaxe
- Ermüdungsfreie Reihenmessung und denkbar einfache Bedienung
- Automatische Empfindlichkeitsregelung



Bitte verlangen Sie den Prospekt Nr. 50–381/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS

Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ *Optar* AG
ZÜRICH
Bahnhofstr. 40 Tel. (051) 25 16 75

Lonza

Lösungsmittel
Methylacetat, Aethylacetat, Butylacetat, Lösungsmittelgemische, n-Butanol

Organische technische Produkte
Formaldehyd, Acetaldehyd, Paraldehyd, Crotonaldehyd, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Natriumacetat, Vinylacetat monomer, Anilinöl, Nitrobenzol, Dicyandiamid, Metaldehyd

Organische Zwischenprodukte
Acetessigäthylester, Acetessigmethylester, Phenylmethylpyrazolon, Acetessiganilid, Acetessig-o-chloranilid und andere Acetessigarylamide, Acetylaceton, Methyläthylpyridin, Nikotinsäure, Nikotinsäureamid, Acetonitril, Isobuttersäurenitril

Kunststoffe
Polyvinylchlorid in verschiedenen Qualitäten, Vinylchlorid/Vinylacetat-Mischpolymerisate, Polyvinylacetat-Dispersionen VIPOLIT® Polymethylmethacrylat in Platten VOS®

Stickstoffprodukte
Ammoniak, Salpetersäure, Ammonnitrat, Natriumnitrat, Natriumnitrit, Ammonsulfat, Harnstoff

Stickstoff- und kombinierte Dünger
Kalksalpeter, Ammonsalpeter, Kalkstickstoff, Ammonsulfat, Nitrophosphat, Nitrophosphatkali, Nitrophosphatkali borhaltig, Volldünger Lonza®, Rebendünger Lonza®, Tabakdünger Lonza®, Lonzin® für Topfpflanzen, Composto Lonza®

Calciumcarbid

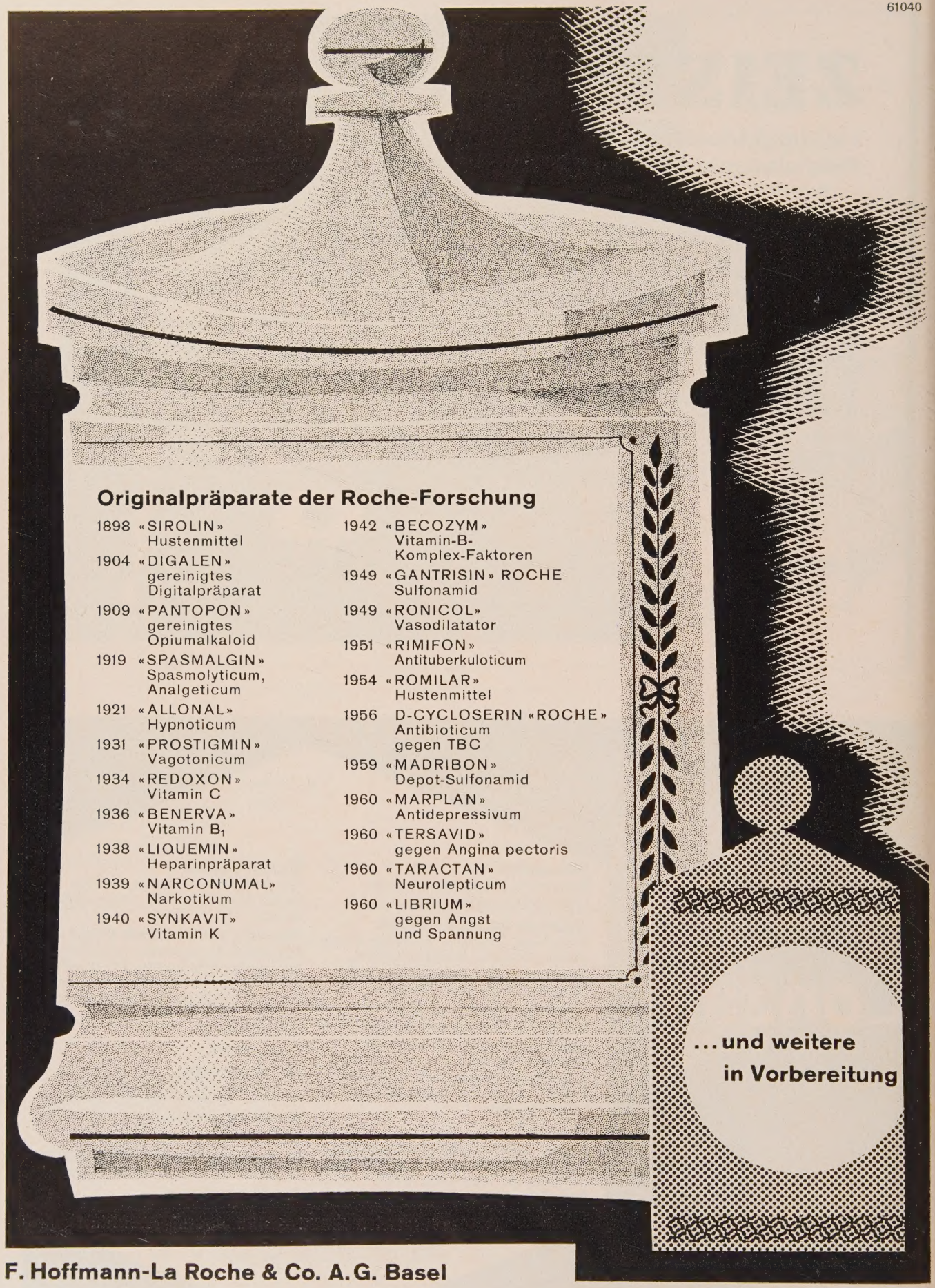
Ferro-Legierungen
Ferrosilicium, Ferrosilicium-Aluminium (Alsimin®, Feralsit®), Ferrosilicium-Mangan-Aluminium (Simanal®)

Siliciummetall (Reinsilicium)

Siliciumcarbid für schleif- und feuerfeste Zwecke sowie Lonsicar® als Betonhartstoff

Graphit min. 99,9 % C

LONZA ELEKTRIZITÄTSWERKE + CHEMISCHE FABRIKEN
AKTIENGESELLSCHAFT BASEL



Originalpräparate der Roche-Forschung

1898 «SIROLIN»
Hustenmittel

1904 «DIGALEN»
gereinigtes
Digitalpräparat

1909 «PANTOPON»
gereinigtes
Opiumalkaloid

1919 «SPASMALGIN»
Spasmolyticum,
Analgeticum

1921 «ALLONAL»
Hypnoticum

1931 «PROSTIGMIN»
Vagotonicum

1934 «REDOXON»
Vitamin C

1936 «BENERVA»
Vitamin B_1

1938 «LIQUEMIN»
Heparinpräparat

1939 «NARCONUMAL»
Narkotikum

1940 «SYNKAVIT»
Vitamin K

1942 «BECOZYM»
Vitamin-B-
Komplex-Faktoren

1949 «GANTRISIN» ROCHE
Sulfonamid

1949 «RONICOL»
Vasodilatator

1951 «RIMIFON»
Antituberkuloticum

1954 «ROMILAR»
Hustenmittel

1956 D-CYCLOSERIN «ROCHE»
Antibioticum
gegen TBC

1959 «MADRIBON»
Depot-Sulfonamid

1960 «MARPLAN»
Antidepressivum

1960 «TERSAVID»
gegen Angina pectoris

1960 «TARACTAN»
Neurolepticum

1960 «LIBRIUM»
gegen Angst
und Spannung

...und weitere in Vorbereitung

F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G. Basel

EXPERIENTIA

Vol. XVII – Fasc. 4 Pag. 145–192 15. IV. 1961

Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäurederivaten auf Kieselgel G. N-(2,4-Dinitrophenyl)-Aminosäuren und 3-Phenyl-2-thiohydantoine*

Von M. Brenner, A. Niederwieser und G. Pataki**

Dinitrophenyl-Aminosäuren (DNP-Aminosäuren) und Phenylthiohydantoine (PTH-Aminosäuren) entstehen, wenn man Proteine oder Peptide mit Dinitrofluorbenzol bzw. Phenyl-Senföl behandelt und das Kondensationsprodukt in geeigneter Weise abbaut[1,2]. Ihre Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch und namentlich ihre Identifizierung ist von erheblicher praktischer Bedeutung, weil die genannten Reaktionsfolgen bei systematischer Anwendung die Sequenzanalyse von Peptidstrukturen ermöglichen. Zahlreiche Autoren haben sich mit dem Problem beschäftigt.

Zur Trennung und Charakterisierung der DNP-Aminosäuren wurde empfohlen: Chromatographie auf neutralem Kieselgel[1], gepuffertem Kieselgel[3], Kieselsäure-Celite[4], Kieselgur[5], gepuffertem Hyflo-Super-Cel[6], Papier[7], acetyliertem Papier[8], chloriertem Kautschuk[9], Amberlite IRC-50 und Duolite C-25[10], Polyamid[11], ferner Ionophorese auf Kieselgel[12] und schliesslich Gegenstromverteilung[13]. Alle diese Methoden erfordern entweder einen gewissen apparativen Aufwand oder relativ viel Zeit.

Der Nachweis der einzelnen PTH-Aminosäuren bereitet noch etwas mehr Mühe. Der ursprüngliche Vorschlag einer alkalischen[2] oder sauren[14] Hydrolyse zwecks anschliessender Identifizierung der freigesetzten Aminosäuren hat nicht befriedigt, weil dabei Arg, CySH, $(Cys)_2$, Ser, Thr, Try, Asp(NH_2) und Glu(NH_2) zerstört werden. 1953 berichteten Landmann et al.[15] sowie Sjöquist[16] über eindimensionale papierchromatographische Trennung der PTH-Aminosäuren selber. Die Unterscheidung versagte indessen einerseits[15] bei Met, Val und Phe, bei Leu und Pro sowie bei Lys und Tyr, andererseits[16] bei Thr und Val, bei Ileu und Val sowie bei Asp(NH_2) und Glu(NH_2). Kürzlich hat Sjöquist[17] ein neues Verfahren angegeben, wobei die wichtigsten PTH-Aminosäuren in vier gleichzeitig laufenden eindimensionalen Papierchromatogrammen unter Verwendung von vier verschiedenen Lösungsmittelsystemen getrennt und quantitativ bestimmt werden können. Asp, Lys, Pro und Hypro lassen sich dabei aber nur indirekt erfassen, und von Leu und Ileu ist nur die Summe bestimmbar. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,5–1 μg PTH-Aminosäure (Grote-Reagens[15,18], Jodazid[16,19], Fluoreszenztest[20]). Sjöquist hat in Fortsetzung einer Untersuchung von Rovery, Fabre und Desnuelle[21] auch ein säulenchromatographisches Trenn- und Bestimmungsverfahren für PTH-Aminosäuren ausgearbeitet[22].

Wie bei der Analyse von Aminosäuremischungen[23,24] beweist die Dünnschicht-Chromatographie auch bei der Identifizierung der DNP- und PTH-Aminosäuren ihre Überlegenheit. Diese besteht vor allem in der Zeitersparnis und in einer Erhöhung der Empfindlichkeit um mindestens eine Zehnerpotenz[25]. Dazu kommt namentlich bei den DNP-Derivaten eine bessere Auftrennung, indem zum Beispiel DNP-Leu und DNP-Ileu mühelos unterscheidbar werden.

*Die Mittel zur Durchführung dieser Arbeit verdanken wir Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes (M. B.), Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber und der Ungarnhilfe der Doktoranden des Botanischen Instituts der Universität Basel, der Kommission für ungarische Flüchtlingsstudenten an der Universität Basel und einem persönlichen Beitrag der Familie M. Bernasconi-Heisserer in Münchenstein (G. P.) sowie einer Studienbeihilfe durch das Kultusministerium Baden-Württemberg (A. N.).

**Institut für organische Chemie der Universität Basel.

[1] F. Sanger, Biochem. J. *39*, 507 (1945); *40*, 261 (1946). – R. Porter und F. Sanger, Biochem. J. *42*, 287 (1948). – F. Sanger, Biochem. J. *45*, 562 (1949).
[2] P. Edman, Acta chem. scand. *4*, 283 (1950).
[3] S. Blackburn, Nature *163*, 955 (1949). – W. R. Middlebrook, Nature *164*, 501 (1949).
[4] F. Ch. Green und L. M. Kay, Anal. Chem. *24*, 726 (1952).
[5] G. L. Mills, Biochem. J. *50*, 707 (1952). – G. Braunitzer und K.-H. Reuther, Makromol. Chem. *18/19*, 501 (1956).
[6] P. H. Bell et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. *51*, 897 (1949).
[7] Eine Zusammenfassung geben G. Biserte et al. in J. Chromatogr. *2*, 225 (1959) und *3*, 85 (1960).
[8] H. S. Burton, Chem. & Ind. (London) *1954*, 576.
[9] S. M. Partridge und T. Swain, Nature *166*, 272 (1950).
[10] T. Seki, J. Biochem. (Japan) *47*, 253 (1960).
[11] H. Steuerle und E. Hille, Biochem. Z. *331*, 220 (1959). – E. Hille, Biochem. Z. *333*, 269 (1960). – H. Hörmann und H. von Portatius, Z. physiol. Chem. *315*, 141 (1959).
[12] R. L. M. Synge, Biochem. J. *44*, 542 (1949).
[13] D. W. Woolley, J. biol. Chem. *179*, 593 (1949).
[14] H. Fraenkel-Conrat, *The Chemical Structure of Proteins*. A Ciba Foundation Symposium (Little Brown & Co., Boston 1953), p. 102.
[15] W. A. Landmann, M. P. Drake und J. Dillaha, J. Amer. chem. Soc. *75*, 3638 (1953).
[16] J. Sjöquist, Acta chem. scand. *7*, 447 (1953).
[17] J. Sjöquist, Biochem. biophys. Acta *41*, 20 (1960).
[18] J. W. Grote, J. biol. Chem. *93*, 25 (1931).
[19] E. Chargaff, C. Levine und C. Green, J. biol. Chem. *175*, 67 (1948).
[20] P. Edman und J. Sjöquist, Acta chem. scand. *10*, 1507 (1956).
[21] M. Rovery, C. Fabre und P. Desnuelle, Biochem. biophys. Acta *12*, 547 (1954).
[22] J. Sjöquist, Arkiv Kemi *11*, 151 (1957).
[23] E. Nürnberg, Arch. Pharm. (Berlin) *292/64*, 610 (1959).
[24] M. Brenner und A. Niederwieser, Exper. *16*, 378 (1960). – A. Niederwieser und G. Pataki, Chimia *14*, 378 (1960).
[25] siehe auch E. Cherbuliez, B. Baehler und J. Rabinowitz, Helv. chim. Acta *43*, 1871 (1960).

DNP-Aminosäuren

(Bearbeitet von A. NIEDERWIESER)

A) *Säure- und wasserlösliche, mit Äther extrahierbare DNP-Aminosäuren*

DNP-Arg, DNP-$CySO_3H$, Mono-DNP$(Cys)_2$, α-DNP-His[26], Di-DNP-His, ε-DNP-Lys und O-DNP-Tyr können durch Chromatographie im System n-Propanol/NH_3 34% (7:3 v/v) einzeln oder, soweit dies praktisch in Frage kommt, nebeneinander identifiziert werden. Die Laufzeit beträgt ca. 2 h. Tabelle I orientiert über die Rf-Werte und die Unterscheidung der Flecken. Obwohl DNP-Arg und ε-DNP-Lys nicht völlig getrennt werden, gelingt es doch, die beiden auf Grund ihrer Unterschiede bei der Ninhydrin-Reaktion auch nebeneinander nachzuweisen. DNP-$CySO_3H$ und Mono-DNP$(Cys)_2$ dürften praktisch nie nebeneinander vorkommen. – Die Probe (1 μg pro DNP-Aminosäure) wird in 1 μl Eisessig oder 0,5 *n* HCl aufgetragen. Es ist wichtig, dass überschüssige Säure vor dem Chromatographieren wieder entfernt wird. Hierzu muss die Platte nach dem Auftragen der Lösung für etwa 10 min bei gutem Luftzug auf ca. 60° erwärmt werden.

B) *Säureunlösliche, mit Äther extrahierbare DNP-Aminosäuren*

Die sichere Identifizierung eines DNP-Derivates, das zu dieser relativ grossen Gruppe gehört, erfordert in der Regel ein zweidimensionales Chromatogramm. Wir verwenden hierzu in der ersten Dimension das «Toluol»-System von BISERTE und OSTEUX[27], und in der zweiten Dimension entweder: Chloroform/Benzylalkohol/Eisessig, oder: Chloroform/t-Amylalkohol/Eisessig, oder: Benzol/Pyridin/Eisessig, oder: Chloroform/Methanol/Eisessig in der unten angegebenen Zusammensetzung. Die Verwendung des zweiphasigen «Toluol»-Systems macht eine Vorbehandlung der Platten nötig und gibt Flecken mit sogenannten «Bärten»[28], zeigt aber im übrigen so gute Trenneigenschaften, dass wir es vorläufig für unentbehrlich halten.

Zur Charakterisierung der genannten Systeme wird zunächst ihre Trennwirkung in eindimensionalen Chromatogrammen beschrieben. Es sei aber gleich festgehalten, dass bei eindimensionalen Chromatogrammen von DNP-Aminosäuremischungen ein nicht unbedeutender Einfluss des Mengenverhältnisses auf die jeweiligen Rf-Werte festgestellt werden kann[29]. In der zweiten Dimension von zweidimensionalen Chromatogrammen ist dies glücklicherweise nicht mehr der Fall. Hier werden die Rf-Werte weniger vom Mischungsverhältnis der Komponenten als von der «Vorgeschichte» der Schicht (Chromatographie in der ersten Dimension, Zwischentrocknung) beeinflusst. Der erwähnte Effekt geht soweit, dass man zwischen den Rf-Werten unterscheiden muss, welche die Systeme Nr. 2 bis 5 direkt bzw. indirekt (das heisst in zweidimensionalen Chromatogrammen nach Einwirkung des «Toluol»-Systems)

Tab. I. Identifizierung der säure- und wasserlöslichen DNP-Aminosäuren durch Dünnschicht-Chromatographie im System n-Propanol/Ammoniak 34% (7:3 v/v)

	Rf · 100	Farbe	Absorption im UV	Farbe mit Ninhydrin
Mono-DNP-$(Cys)_2$	29	gelb	+	braun
DNP-$CySO_3H$	29	gelb	+	gelb
α-DNP-Arg	43	gelb	+	gelb
ε-DNP-Lys	44	gelb	+	braun
O-DNP-Tyr	49	farblos	+[a]	violett
α-DNP-His	57	gelb	+	gelb
Di-DNP-His	65	gelb	+	gelb

[a] siehe unter *Sichtbarkeit der Flecken, Verwendung von UV-Licht, Dokumentation.*

ergeben (vgl. Tab. II). Weil sich die «Vorgeschichte» weitgehend standardisieren lässt, sind die Rf-Werte der zweiten Dimension gut reproduzierbar. Mischungen geben deshalb beim zweidimensionalen Chromatographieren charakteristische Fleckenmuster, die durch Rf-Wert-Schwankungen kaum verfälscht werden. Man chromatographiert deshalb eine unbekannte Probe vorteilhaft nicht für sich allein, sondern zusammen mit einer Standardmischung, die von jeder in Frage kommenden DNP-Aminosäure gerade so viel enthält (0,2 μg), dass die einzelnen Komponenten nach der zweidimensionalen Trennung eben noch sichtbar werden[30] (Fig. 1). Die Verbindung in der Probelösung gibt sich dann in den meisten Fällen sofort und einwandfrei durch die Intensität des ihr zukommenden Fleckens zu erkennen.

Lösungsmittelsysteme und Rf-Werte

Qualität der Lösungsmittel. Toluol: Zweimal mit je 1/10 Volumteil konz. Schwefelsäure ausschütteln, mit Wasser, 2 *n* Sodalösung und Wasser waschen, über Chlorcalcium trocknen und durch kurze Kolonne destillieren. *Pyridin:* 24 h über Bariumoxyd kochen und durch kurze Kolonne destillieren. *Äthylenchlorhydrin:* 2-Chloräthanol puriss. «Fluka»[31]. *Ammoniak:* 25% Ammoniak «Merck» mit destilliertem Wasser verdünnen. *Benzylalkohol:* Ausschütteln mit gesättigter Bisulfitlösung, waschen mit 2 *n* Soda, trocknen über Natriumsulfat und unter N_2 durch kurze Kolonne im

[26] Das im-DNP-His gehört grundsätzlich auch zur Gruppe der säurelöslichen DNP-Derivate. Nach H. ZAHN und H. PFANNMÜLLER (Biochem. Z. *330*, 97 (1958)) ist es aber seiner Unbeständigkeit wegen in Hydrolysaten von entsprechenden DNP-Peptiden nicht nachweisbar. Wir haben unsere Untersuchung deshalb auf das α-DNP- und das Di-DNP-His beschränkt.

[27] G. BISERTE und R. OSTEUX, Bull. Soc. Chim. biol. *33*, 50 (1951).

[28] vgl. I. M. HAIS in HAIS und MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie* (VEB Gustav-Fischer-Verlag, Jena 1958), p. 147.

[29] Von der Papierchromatographie her ist bereits bekannt, dass insbesondere Dinitrophenol[31] in dieser Weise störend wirkt[27].

[30] Eine Lösung von je 1 mg DNP-Aminosäure in total 5 ml Aceton hält sich im Kühlschrank mindestens 4 Wochen lang. Zum Versuch braucht man 1 μl.

[31] Buchs, SG (Schweiz).

Tab. II. Rf-Werte[a] der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren in den Lösungsmittelsystemen Nr. 1–5 bei eindimensionaler, aufsteigender bzw. horizontaler[33] Chromatographie

	1[b]	2		3		4[c]			5[c]		
	aufsteigend	aufsteigend		aufsteigend		aufsteigend	horizontal		aufsteigend	horizontal	
			indirekt[d]		indirekt[d]			indirekt[d]			indirekt[d]
DNP-AAB[e]	46	72	44	73	42	52	52	55	79	85	75
DNP-AAC[f]	79	92	66	83	57	105	108	109	108	101	106
DNP-Ala	34	54	35	60	34	32	33	38	59	66	58
DNP-β-Ala	27	71	57	73	50	89	98	100	99	95	102
DNP-Asp	02	13	08	09	13	06	05	11	07	06	06
DNP-Glu	01	26	17	31	21	12	12	23	12	12	14
DNP-Gly	27	32	22	40	23	17	18	22	31	38	31
DNP-Ileu	64	83	63	81	57	107	107	107	100	101	104
DNP-Leu	66	82	62	80	54	100	100	100	100	100	100
DNP-Nleu	69	82	60	80	52	86	90	88	101	100	98
DNP-Met	55	70	39	69	38	43	43	47	72	81	74
DNP-Met.O_2[g]	17	—	—	—	04	03	03	02	10	10	07
DNP-Phe	67	75	46	74	41	44	46	52	81	86	76
DNP-Pro	29	65	41	67	38	58	59	62	78	84	75
DNP-Sar	23	56	35	57	32	34	35	41	59	65	60
DNP-Ser	15	11	10	11	10	09	10	14	07	08	07
DNP-Thr	20	17	13	15	12	12	14	20	09	11	11
DNP-Try	65	69	38	69	31	23	25	33	54	61	49
DNP-Val	53	79	56	77	51	76	81	85	91	98	86
DNP-Nval	56	77	52	76	48	65	70	75	86	95	89
Di-DNP-$(Cys)_2$	—	03	02	01	01	00	00	02	00	02	02
Di-DNP-His	53	11	09	08	04	05	04	08	12	16	14
Di-DNP-Lys	74	56	35	60	30	12	13	19	66	73	65
Di-DNP-Orn	70	34	23	40	20	06	06	10	39	46	39
Di-DNP-Tyr	76	58	35	60	30	17	16	19	57	65	57
2,4-DNP-OH[32]	41	100	76	83	55	22	21	23	148	102	111
2,4-DNP-NH_2[32]	90	90	84	72	63	115	128	129	131	101	115

[a] angeführt ist Rf·100. [b] vgl. Text über Versuchstechnik. [c] Rf-Werte auf DNP-Leu bezogen. [d] nach «Vorbehandlung» der Schicht durch Chromatographie im «Toluol»-System (Nr. 1) und Zwischentrocknung (siehe Text). [e] AAB = α-Aminobuttersäure. [f] AAC = α-Aminocaprylsäure. [g] Met.O_2 = Methioninsulfon.

Vakuum destillieren. Beigemengter Benzaldehyd verändert die Rf-Werte ziemlich stark. *Methanol* und *Eisessig:* durch kurze Kolonne destillieren. *Chloroform:* zweimal durch kurze Kolonne destillieren. *t-Amylalkohol:* die Fraktion 100,5–102,0° durch kurze Kolonne aus t-Amylalkohol pract. «Fluka»[31] herausdestillieren. *Benzol:* wie Toluol.

Die nachstehenden Angaben über die Mischungsverhältnisse der Systeme Nr. 1–5 beziehen sich auf Volumina bei ca. 20° C.

Lösungsmittelsysteme. Nr. 1: Toluol-Pyridin-Äthylenchlorhydrin-0,8*n*. Ammoniak (100:30:60:60). («Toluol»-System)[27]. Die obere Phase dient zur Chromatographie, die untere zur Vorbehandlung der Dünnschicht (vgl. Versuchstechnik). Dieses System gibt Flecken mit langen «Bärten»[28]. Damit ist natürlich ein gewisser Substanzverlust verbunden.

Nr. 2: Chloroform-Benzylalkohol-Eisessig (70:30:3). Dieses System gibt symmetrische Flecken. 2,4-Dinitrophenol[32] und 2,4-Dinitranilin wandern an die Spitze.

Nr. 3: Chloroform-t-Amylalkohol-Eisessig (70:30:3). Dieses System trennt ähnlich wie System Nr. 2. 2,4-Dinitrophenol[32] und DNP-Val rücken näher an DNP-Leu. Dafür ist der t-Amylalkohol stabiler und leichter flüchtig als Benzylalkohol.

Tab. III. Bemerkenswerte Trenneffekte und Laufzeiten bei eindimensionaler Chromatographie in den Lösungsmittelsystemen Nr. 1–5

System Nr.	Abtrennung der DNP-Aminosäuren von		Trennung der DNP-Derivate von		Trennung der Di-DNP-Derivate von Tyr, Lys	Laufzeit
	Dinitroanilin[32]	Dinitrophenol[32]	Leu, Ileu, Nleu	Val, Nval		
1	+	–[a]	–	–	–	1 h/15 cm
2	+	+	–	–	–	1½ h/10 cm
3	–[e]	–[b]	–	–	–	1 h/15 cm
4[f]	+	–[c]	+	+	–	2–3 h
5[f]	–[d]	–[d]	–	+	+	2–3 h

[a] 2,4-Dinitrophenol liegt zwischen DNP-Val und DNP-Ala.
[b] 2,4-Dinitrophenol liegt bei DNP-Leu.
[c] 2,4-Dinitrophenol liegt zwischen DNP-Ala und DNP-Gly.
[d] 2,4-Dinitrophenol und 2,4-Dinitranilin liegen knapp über DNP-Leu.
[e] 2,4-Dinitranilin liegt zwischen DNP-Phe und DNP-Met.
[f] Horizontale Chromatographie (vgl. [33]). DNP-Leu läuft in $2^1/_2$ h etwa 10 cm weit.

[32] 2,4-Dinitrophenol und 2,4-Dinitranilin sind Nebenprodukte bei der Synthese und der sauren Hydrolyse von DNP-Peptiden.

[33] M. Brenner und A. Niederwieser, *Durchlaufende Dünnschicht-Chromatographie*, Exper. im Druck (1961).

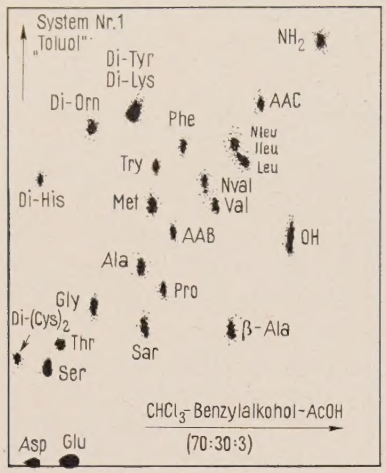


Fig. 1. Zweidimensionales Chromatogramm einer Standard-Mischung von je 0,2 µg DNP-Aminosäure in den Systemen Nr.1 und 2. Symbole: OH = 2,4-Dinitrophenol [32], NH_2 = 2,4-Dinitranilin [32], Di = Di-DNP-Derivate, vgl. auch Tab. II. UV-Photokopie, Original 12×10 cm.

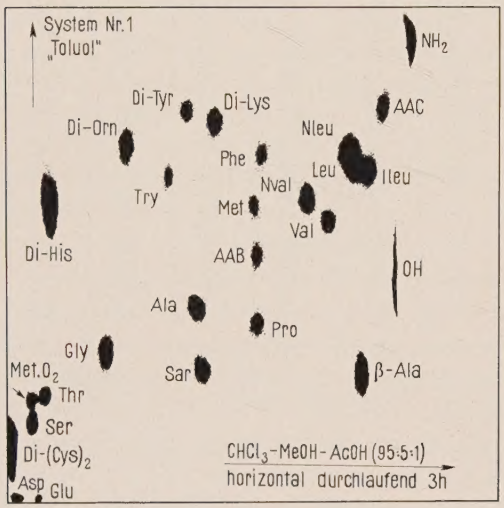


Fig. 2. Zweidimensionales Chromatogramm von je 1 µg DNP-Aminosäure in den Systemen Nr. 1 und 5. Symbole vgl. Fig. 1. UV-Photokopie, länger belichtet als bei Fig. 3, Original 13×13 cm.

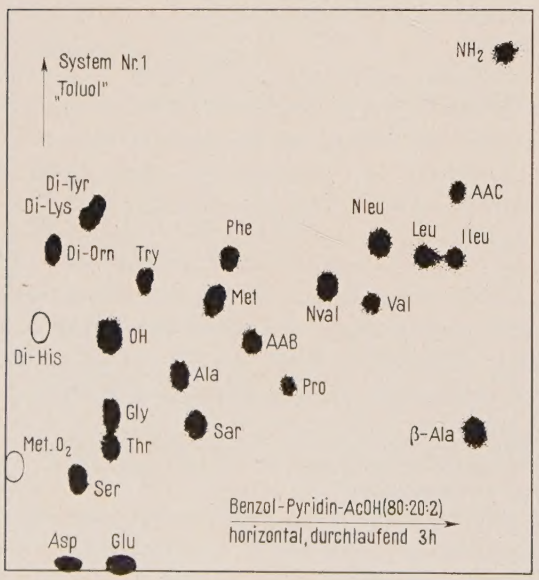


Fig. 3. Zweidimensionales Chromatogramm einer Mischung von je 1 µg DNP-Aminosäure in den Systemen Nr. 1 und 4. Symbole: vgl. Fig. 1; Di-His und Met.O_2 sind im abgebildeten Chromatogramm nicht mitgelaufen. UV-Photokopie, Original 15×14 cm.

Nr. 4: Benzol-Pyridin-Eisessig (80:20:2). Bei durchlaufender Chromatographie [33] eignet sich dieses System hervorragend zur Trennung der weniger polaren DNP-Aminosäuren. 2,4-Dinitranilin [32] wandert an der Spitze: $R_{DNP\text{-}Leu} = 1{,}28$.

Nr. 5: Chloroform-Methanol-Eisessig (95:5:1). Di-DNP-Tyr und Di-DNP-Lys, welche in keinem der vorgehend beschriebenen Systeme getrennt werden, lassen sich hier bei durchlaufender Chromatographie [33] eindeutig unterscheiden.

Tabelle II orientiert über die Rf-Werte in den genannten Lösungsmittel-Systemen. In Tabelle III sind die Laufzeiten und einige Besonderheiten, welche eine spezielle Erwähnung rechtfertigen, zusammengestellt.

Trenneffekte im zweidimensionalen Verfahren. Figur 1 zeigt die Auftrennung einer Standardmischung von je 0,2 µg DNP-Aminosäure bei Kombination der Systeme Nr. 1 und Nr. 2. Keine Trennung erfolgt bei der Leucin-Gruppe, bei der Valin-Gruppe und bei Di-DNP-Lys/Di-DNP-Tyr.

Zur Auftrennung der letzteren verwendet man die Kombination von Nr. 1 mit Nr. 5 (Fig. 2), oder gegebenenfalls Nr. 5 allein. Die Kombination von Nr. 1 mit Nr. 4 (Fig. 3) ermöglicht die Unterscheidung der isomeren Leucin-Derivate und der isomeren Valin-Derivate.

C) *Versuchstechnik*

Allgemeines

Die allgemeine Versuchstechnik haben wir schon früher beschrieben [24]. Die dortigen Angaben sind genau zu befolgen. Ergänzend sei noch folgendes bemerkt:

1. Die Schichtdicke ist bei gleichem Streichgerät und gleichem Verhältnis Kieselgel G zu Wasser natürlich von der Streichgeschwindigkeit abhängig.

2. Relativ harte Schichten erhält man, wenn die bestrichenen Platten an der Luft über Nacht bei 20°C trocknen können. Schon wenn wenig über 100°C getrocknet wird, kann der im Kieselgel G enthaltene Gips seine Funktion als Bindemittel nicht mehr richtig erfüllen. Man erkennt dies daran, dass die Schicht weich, fast pulverig wird. Platten, die man bei höherer Temperatur «aktiviert» (zum Beispiel 2 h bei 140° nach CHERBULIEZ et al. [25]), müssen schliesslich gegen Luftfeuchtigkeit empfindlich werden [34], und es ist nicht verwunderlich, wenn bei ihrer Verwendung störende Rf-Wert-Schwankungen auftreten.

3. Bei schmalen Platten (200×50 mm) erhält man trotz Streichgerät häufig ungleichmässige Schichten. Sie eignen sich deshalb zwar ausgezeichnet für orientierende, weniger aber für genauere Versuche.

4. Auf das Durchziehen eines Trennungsstriches zur Begrenzung der Laufstrecke (und der Laufzeit!) haben wir neuerdings ohne Schaden für das Experiment ver-

[31] R. E. KIRK und D. F. OTHMER, *Encyclopedia of Chemical Technology* (Interscience Publishers Inc. New York 1948), Vol. 2, p. 773.

richtet. Man gewinnt sogar den Vorteil einer weniger starren Zeiteinteilung.

Einige spezielle Hinweise erfordert die Verwendung des «Toluol»-Systems.

Das «Toluol»-System

Vorbehandlung der Dünnschicht. Eine mit Filterpapier ausgeschlagene Trennkammer (Firma DESAGA) wird mit der unteren Phase des «Toluol»-Systems beschickt. Auf den Boden der Kammer legt man als Rost einen dicken gebogenen Glasstab. Zwei mit Kieselgel G präparierte Platten werden mit der Schichtseite nach aussen auf die Mitte des Rostes gestellt und jede wird mit der oberen Kante an eine Kammerwand gelehnt. Um zu vermeiden, dass Lösungsmittel vom Filterpapier auf die Schicht gelangt, trennt man diese durch einen kräftigen Strich mit einem Bleistift parallel zur Oberkante entzwei. Man lässt über Nacht stehen. Das Kieselgel nimmt dabei viel Feuchtigkeit auf, was man nicht am Aussehen, wohl aber zum Beispiel daran erkennt, dass auf die Platte gebrachte Substanzen während dieser Behandlung ganz erheblich diffundieren können.

Die Chromatographie auf einer derart vorbehandelten Platte beruht wahrscheinlich auf einer Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen. Jedenfalls geht die Wirkung der Vorbehandlung an Platten, die ungeschützt an der Luft verweilen, schon nach 45 min praktisch verloren. Dieser Effekt ist bei Benützung der Platten zu beachten.

Auftragen der Substanzproben. Lässt man eine Platte zwischen Vorbehandlung und Chromatographie während verschiedener Zeiten ungeschützt an der Luft liegen und trägt man dann die Logarithmen der Rf-Werte gegen die Logarithmen der zugehörigen Zeiten auf, so zeigt es sich, dass schon nach etwa 2 min ein linearer Abfall eintritt. Wir bedecken deshalb die vorbehandelte Schicht nach Entfernung aus der Kammer sofort mit einer Glasplatte, welche nur einen etwa 1,5 cm breiten Streifen an der unteren Kante freilässt. Hier können nun die Substanzproben in Ruhe aufgetragen werden. Benötigt man dazu nicht mehr als etwa 5 min, so ist die Störung unbedeutend. Das Auftragen lässt sich beschleunigen, wenn man relativ konzentrierte Lösungen verwendet. Das Volumen soll 1 μl womöglich nicht übersteigen, weil die Verdampfungsgeschwindigkeit der aufgetragenen Lösungen auf vorbehandelten feuchten Schichten kleiner ist als auf trockenen. Nach beendetem Auftragen wird die Deckplatte vorsichtig entfernt und das Chromatogramm unverzüglich angesetzt.

Zwischentrocknung bei zweidimensionalen Chromatogrammen. Man lässt 10 min im Luftzug (gut ventilierte Kapelle) liegen, erwärmt im Trockenschrank 10 min auf 60° und lässt im Luftzug 10–15 min abkühlen. Hierauf kann sofort in der zweiten Dimension chromatographiert werden. Längeres Trocknen empfiehlt sich nicht, weil beim Liegenlassen an der Luft mit teilweiser Zerstörung der DNP-Aminosäuren zu rechnen ist: die Oxydation von DNP-Met kann bei darauffolgender Chromatographie die Anwesenheit von Di-DNP-His vortäuschen. Ist nach der Zwischentrocknung ein längeres Aufbewahren nötig, so muss die Schicht mit einer Glasplatte bedeckt und im Dunkeln aufbewahrt werden.

Sichtbarkeit der Flecken, Verwendung von UV-Licht, Dokumentation

Mit Ausnahme von O-DNP-Tyr sind alle DNP-Derivate gelb. Mengen von 0,1 μg (eindimensionale Chromatogramme) oder 0,5 μg (zweidimensionale Chromatogramme) geben Flecken, die noch gut sichtbar sind, wenn man die Platte im durchfallenden Tageslicht betrachtet. Das Chromatogramm soll innerhalb einiger Stunden kopiert werden, da die Flecken im Lauf der Zeit merklich verblassen.

Gewöhnlich kopieren wir die Chromatogramme im Gegenlicht mit Tinte (weiche Feder) auf Pergaminpapier, das mit zwei Papierklammern auf die Schicht gespannt wird. Bei einiger Übung erkennt man auf der weissen Kieselgelschicht selbst schwächste hellgelbe Flecken. In vielen Fällen ist es trotzdem bequemer, die Platte im durchfallenden UV-Licht (Lichtquelle → Schicht → Glasplatte → Brille → Auge) zu betrachten. Hierbei sind die DNP-Aminosäuren als tiefdunkle Flecken erkennbar. Schwach absorbierende Substanzen in kleinen Konzentrationen sieht man schlecht, da die Kieselgel-Gipsschicht selber absorbiert und daher auch dunkel erscheint. Gibt man jedoch 0,5 g Zinksilikat[35] zu 25 g Kieselgel G, so wird die Schicht durch Fluoreszenz aufgehellt und O-DNP-Tyr selbst in kleinen Mengen erkennbar (ca. 0,06 μg).

Besonders empfehlenswert ist die Anfertigung einer UV-Photokopie[36]. Gevaert GEVACOPY Papier wird mit der empfindlichen Seite direkt auf die Schicht gelegt und mit einer Glasplatte angepresst. Man lässt dann für einige Sekunden UV-Licht durch die Schicht hindurch auf das Photopapier fallen und entwickelt in üblicher Weise ein Positiv. Die Figuren 1–3 sind auf diese Weise hergestellt worden. Die grösste Empfindlichkeit resultiert bei einer Belichtungszeit, welche den Hintergrund des Negativs noch nicht schwarz, sondern erst grau erscheinen lässt. Es entsteht dabei eine unverfälschte Kopie. Bei längerer Belichtungszeit wird der Hintergrund des Negativs zunehmend schwärzer; gleichzeitig vermindern die hellen Substanzflecken ihren Durchmesser, um bei Überbelichtung schliesslich ganz zu verschwinden. Hievon lässt sich Gebrauch machen, um grosse Flecken, die sich teilweise überdecken, in kleinere getrennte Flecken aufzulösen.

[35] Zinksilikat Leuchtstoff P 1, Type 118-2-7, General Electric, Cleveland/Ohio.

[36] vgl. dazu auch H. GRÜNEWALD, Photographie und Wissenschaft *8*, 18 (1959).

PTH-Aminosäuren

(Bearbeitet von G. PATAKI)

Die Lösungsmittelsysteme, welche zur papierchromatographischen Trennung der PTH-Aminosäuren verwendet werden[15–17,20], sind auf dem von uns benützten Kieselgel G unbrauchbar. Befriedigende Trenneffekte haben wir hingegen mit den in Tabelle IV angegebenen Mischungen erzielt; in geeigneter Kombination ermöglichen die Systeme Nr. 6–9 die direkte Identifizierung von 14 der insgesamt 19 angeführten PTH-Derivate der Tabelle IV.

PTH-Val, PTH-Phe, PTH-Met einerseits, sowie PTH-Leu und PTH-Ileu anderseits, wandern ausnahmslos gemeinsam. Sie müssen deshalb im allgemeinen Fall nach vorgängiger Hydrolyse in Form der freien Aminosäuren identifiziert werden; liegt PTH-Met allein vor, so ist es nach Behandlung mit H_2O_2 ohne Hydrolyse direkt erkennbar. Oft wird aber schon die Bestimmung der Bruttozusammensetzung eines Peptids (Totalhydrolyse) genügend Information liefern, um eine Abkürzung des Identifizierungsverfahrens von Val und Phe bzw. Leu und Ileu zu gestatten.

Lösungsmittelsysteme, Farbreaktionen der PTH-Aminosäuren und Rf-Werte

Qualität der Lösungsmittel. Chloroform: stabilisiert mit 1,5% Äthanol («Fluka»[31]), *Ameisensäure:* wasserfrei («Fluka»[31]), *Eisessig, Methanol* und *Methyläthylketon:* handelsübliche Qualitäten durch kurze Kolonne destillieren, *Pyridin:* 24 h über Bariumoxyd kochen und durch kurze Kolonne destillieren.

Die nachstehenden Angaben über die Mischungsverhältnisse der Systeme Nr. 6–10 beziehen sich auf Volumina bei ca. 20° C.

Lösungsmittelsysteme. Nr. 6: Chloroform. Nr. 7: Chloroform-Methanol (9:1). Nr. 8: Chloroform-Ameisensäure (100:5). Nr. 9: Chloroform-Methanol-Ameisensäure (70:30:2). Nr. 10: Methyläthylketon-Pyridin-Wasser-Eisessig (70:15:15:2).

Farbreaktionen. Das von EDMAN und SJÖQUIST[20] und neuerdings von CHERBULIEZ[25] zum Sichtbarmachen verwendete Jodazid ist nach unserer Erfahrung kein ideales Reagens für die PTH-Aminosäuren. Wir erhalten bei unseren Kieselgel G-Schichten weisse Flekken auf hellblauem Hintergrund, die man schlecht sieht und die schnell wieder verschwinden. Grote-Reagens[18] wäre besser, ist aber in der Anwendung umständlich und zeitraubend. Sehr gute Dienste leistet der Chlor-Tolidin-Test. Man lässt nach dem Chlorieren[37], vor Luftzug geschützt, 3–5 min stehen. Bei sehr vorsichtigem Besprühen erhält man augenblicklich fast punktförmige Flecken; besprüht man weiter, so werden sie alsbald grösser und können sich dann unter Umständen mit benachbarten Flecken überdecken (vgl. zum Beispiel Flecken 10 und 11 in Fig. 4). PTH-Gly gibt als einzige PTH-Aminosäure eine charakteristische Fleckenform, an der man es sofort erkennen kann (Fig. 4).

Tab. IV. Rf-Werte der PTH-Aminosäuren in den Lösungsmittelsystemen Nr. 6–9 bei eindimensionaler aufsteigender Chromatographie. Versuchstechnik vgl. [24]

PTH	Nr. 6 $CHCl_3$	Nr. 7 $CHCl_3$–CH_3OH (9:1 v/v)	Nr. 8 $CHCl_3$–HCOOH (100:5 v/v)	Nr. 9 $CHCl_3$–CH_3OH–HCOOH (70:30:2 v/v)
Ala	0,16	0,68	0,39	~1
Arg	0	0,01	0	0,24
Asp	0	0,01	0,13	0,70
Asp(NH_2)	0	0,23	0,07	~1
Glu	0,01	0,04	0,17	0,75
Glu(NH_2)	0,01	0,28	0,08	~1
Gly	0,10	0,56	0,33	0,90
His	0,01	0,29	0	~1
Ileu	0,40	0,77	0,57	~1
Leu	0,40	0,77	0,60	~1
Lys	0,12	0,71	0,34	~1
Met	0,33	0,75	0,51	~1
Met-Sulfoxyd	0,01	0,40	0,12	~1
Phe	0,28	0,74	0,50	~1
Pro	0,60	0,82	0,65	~1
Thr	0,04	0,45	0,15	~1
Try	0,13	0,62	0,39	~1
Tyr	0,03	0,47	0,21	~1
Val	0,32	0,74	0,55	~1

Fleckengrösse und Rf-Werte. Bei PTH-Pro haben wir in System Nr. 7 die Abhängigkeit der Fleckengrösse von der Substanzmenge geprüft. Wenn die Verbindung jedesmal in 0,5 µl Methanol aufgetragen wird, so ist die Fleckenfläche bei Beladungen zwischen 0,05 und 72 µg ungefähr dem *log* der Substanzmenge proportional. Der Rf-Wert bleibt praktisch konstant.

Tabelle IV orientiert über die Rf-Werte, welche man beobachtet, wenn die angegebenen Substanzen einzeln aufgetragen (0,5 µg in 0,5 µl Methanol) und chromatographiert werden. Beim Vorliegen von Mischungen, die in einem Totalvolumen von ebenfalls 0,5 µl aufgetragen werden, können Abweichungen der Rf-Werte auftreten. Man verlässt sich deshalb bei Identifizierungen wie im Fall der DNP-Aminosäuren besser auf einen direkten Vergleich mit Kontrollsubstanzen oder auf das Fleckenmuster eines zweidimensionalen Chromatogramms (Beladung wie im eindimensionalen Chromatogramm).

Identifizierung von PTH-Aminosäuren

A) *Einzelne PTH-Aminosäuren oder einfache Gemische.* Die erwähnte Unsicherheit in bezug auf die Rf-Werte lässt es ratsam erscheinen, eine unbekannte PTH-Aminosäure zunächst zweidimensional in den Systemen Nr. 7 und 8 zu chromatographieren und auf

[37] F. REINDEL und W. HOPPE, Chem. Ber. *87*, 1103 (1954). Modifizierung siehe M. BRENNER et al., Helv. chim. Acta *40*, 1497 (1957). Die Chlorbehandlung ist hier auf 25 min auszudehnen!

Grund des Fleckenmusters in Figur 4 eine vorläufige Zuordnung zu treffen. Diese wird in einem zweiten Versuch, in welchem einige im Fleckenmuster benachbarte PTH-Aminosäuren mitchromatographiert werden, bestätigt[38]. 11 Substanzen sind so direkt identifizierbar.

Spezialfälle. Asp, Glu: Das Auftreten eines Fleckens an der Stelle 2 (Fig. 4) kann auf PTH-Asp oder PTH-Glu oder beide zurückzuführen sein. Zur Unterscheidung chromatographiert man eindimensional im System Nr. 9; die Zuordnung bietet keine Schwierigkeiten, wenn man die beiden Substanzen als Kontrollen mitlaufen lässt (vgl. Fig. 5).

Pro: Liegt die Unbekannte rechts oben im Gebiet des grossen Fleckens 13, so chromatographiert man eindimensional im System Nr. 6 und lässt gleichzeitig als Vergleichssubstanzen die PTH-Derivate von Val, Met, Phe, Ileu, Leu und Pro mitlaufen (vgl. Fig. 6). Der Versuch gestattet innert $^1/_2$ h eine Entscheidung zwischen PTH-Pro oder [PTH-Ileu + PTH-Leu] oder [PTH-Val + PTH-Met + PTH-Phe].

Met: Handelt es sich um die letztere dieser drei Möglichkeiten, so kann die Anwesenheit von PTH-Met durch ein weiteres eindimensionales Chromatogramm im selben System festgestellt werden, wenn die Probe vorher mit H_2O_2 behandelt wird. Das Ausmass der Oxydation hängt vom Verhältnis H_2O_2 zu PTH-Aminosäure ab. Deshalb belädt man eine neue Platte viermal (A, B, C, D) mit der gleichen Menge der Unbekannten, lässt 60 sec trocknen (Lösungsmittel Methanol) und setzt dann jedesmal 0,5 μl H_2O_2 zu: bei A 30/4-, bei B 30/8-, bei C 30/16-, bei D 30/32-proz. H_2O_2. Schon nach 2 min kann man chromatographieren. Figur 7 zeigt die resultierende Substanzverteilung in Abhängigkeit von der Oxydationswirkung. Man wertet dort aus, wo die Oxydation am wenigsten Nebenprodukte liefert (zum Beispiel bei C in Fig. 7). Tritt nur ein Fleck am Startpunkt auf und höchstens ein undeutlicher Nebenfleck weiter oben, so ist die Anwesenheit von PTH-Met erwiesen. Falls auch oberhalb des Startpunktes deutliche Flecken auftreten, so liegt nicht nur PTH-Met, sondern auch PTH-Val oder PTH-Phe oder ein Gemisch der beiden vor. Kein Flecken am Startpunkt bedeutet Abwesenheit von PTH-Met; wie bei allen Beweisführungen auf negativer Basis ist indessen bei dieser Folgerung Vorsicht geboten.

Leu, Ileu, Phe, Val (und Met): Sind auf Grund der Chromatogramme nach Figur 4 und 6 eine oder mehrere Aminosäuren aus dieser Gruppe anwesend, so hydrolysiert man etwa 1 μg der Probe 12 h mit 6n HCl bei 120° im Rohr, verdampft zur Trockne, nimmt in Wasser auf und chromatographiert eindimensional in n-BuOH-AcOH-H_2O (60:20:20) bzw. Phenol-H_2O (75:25): Phe, Val und Met lassen sich sowohl unter sich als auch von den Leucinen unterscheiden[24]. Zur Unterscheidung der Leucine dient bei Abwesenheit von Phe, Val und Met ein Durchlaufchromatogramm nach

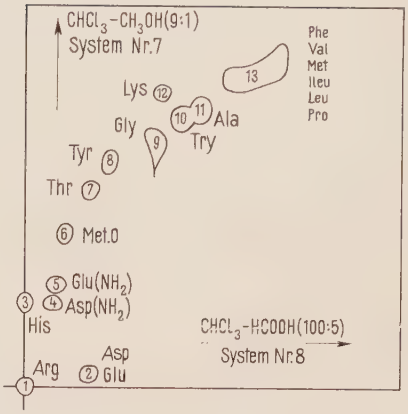


Fig. 4. Zweidimensionales Chromatogramm einer Mischung von je 0,5 μg PTH-Aminosäure in den Systemen Nr. 7 und 8. (Met.O = Methioninsulfoxyd.) Original 10 × 10 cm.

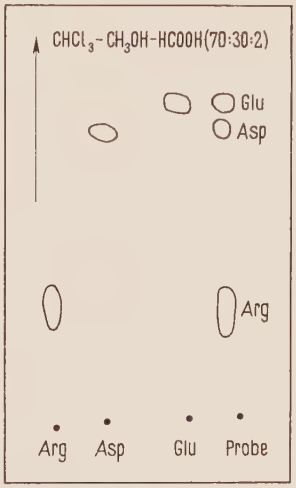


Fig. 5. Eindimensionales Chromatogramm im System Nr. 9 zum Nachweis von PTH-Asp und PTH-Glu. Kontrollen: je 0,5 μg. PTH-Arg in der Probe tritt nur im Spezialfall komplexer Gemische auf (vgl. Text). Laufstrecke 11 cm.

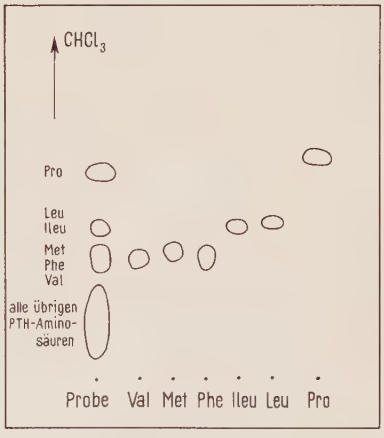


Fig. 6. Eindimensionales Chromatogramm im System Nr. 6 zum Nachweis von PTH-Pro, PTH-Leu + PTH-Ileu und PTH-Met + PTH-Phe + PTH-Val. Kontrollen: je 0,5 μg. Laufstrecke 10 cm.

[38] Der direkte Vergleich mit einer Standard-Mischung (vgl. DNP-Aminosäuren) ist wegen der beschränkten Haltbarkeit (72 h) von methanolischen PTH-Aminosäure-Lösungen kostspielig.

Figur 8 im System Nr. 10[33]. – Dieses Verfahren zur Trennung der Leucine ist auch anwendbar, wenn das PTH-Leucin-Gemisch erst durch eindimensionale Chromatographie nach Figur 6 von anderen PTH-Aminosäuren abgetrennt werden muss (vgl. B: Komplexe Gemische). Man eluiert in diesem Fall den Leucin-Fleck vom eindimensionalen Chromatogramm mit Methanol[24], hydrolysiert und chromatographiert nach der Durchlauf-Methode[33]. Zur sicheren Identifizierung ist es erforderlich, dass die auf das eindimensionale Chromatogramm gebrachte Probe mindestens 1 μg PTH-Leu und/oder 1 μg PTH-Ileu enthält.

Bemerkung. Wenn man nicht hydrolysieren muss, erfordern alle oben beschriebenen Experimente insgesamt höchstens 1 μg Material pro PTH-Aminosäure. Man wird es deshalb oft vorziehen, auf Kosten von etwas Substanz Zeit zu sparen und die verschiedenen Chromatogramme nicht hintereinander, sondern nebeneinander laufen zu lassen. Der Zeitbedarf der einzelnen Operationen beträgt: Auftragen: 5 min; Laufzeit/10 cm: 30 min; Trocknen: 5 min; Chlorieren: 25 min; Tolidin: 2 min; H_2O_2: 12 min.

B) *Komplexe Gemische.* Weist das zweidimensionale Chromatogramm (Fig. 4) zahlreiche Flecken auf, so wird eventuell eine Elution notwendig. Man bereitet ein neues Chromatogramm, verzichtet auf die Chlor-Tolidin-Behandlung und streift das Gebiet der Flecken 1 und 2 einerseits und 13 andererseits von der Platte ab. Zum Eluieren wird das Kieselgel G in etwa 1 ml Methanol suspendiert. Man hält 2 min auf 40–50°, filtriert, wäscht dreimal mit heissem Methanol nach und verdampft zur Trockne.

Das vereinigte Material aus Flecken 1 und 2 wird nach Figur 5 eindimensional im System Nr. 9 mit PTH-Arg, PTH-Asp und PTH-Glu als Kontrolle chromatographiert.

Mit dem Eluat aus Flecken 13 verfährt man nach den Angaben über Pro; Met; Leu, Ileu, Phe, Val (und Met) im voranstehenden Abschnitt A.

Schlussfolgerung

DNP-Aminosäuren. Ausser DNP-Hypro, das nicht untersucht wurde, lassen sich die DNP-Derivate aller Eiweiss-Aminosäuren (Tab. I und II) durch drei gleichzeitige Chromatogramme in verschiedenen Systemen (Tab. I, Fig. 2 und 3) auf einfachste Weise voneinander trennen. Der Zeitbedarf pro Dimension beträgt nur 1–3 h. Zum sicheren Nachweis einer DNP-Aminosäure mittels UV-Photokopie genügen noch $2 \cdot 10^{-3}$ μM, bei eindimensionaler Chromatographie sogar 10^{-4} μM, das heisst zum Beispiel 0,02 μg DNP-Ser. Bei hohen Beladungen (ca. 100 μg) gelingt es deshalb häufig, noch 0,05% (!) einer beigemengten fremden DNP-Aminosäure einwandfrei zu erfassen.

PTH-Aminosäuren. Ein zweidimensionales (Fig. 4) und zwei eindimensionale (Fig. 5 und 6) Chromatogramme, die man ohne langwierige Äquilibrierung und

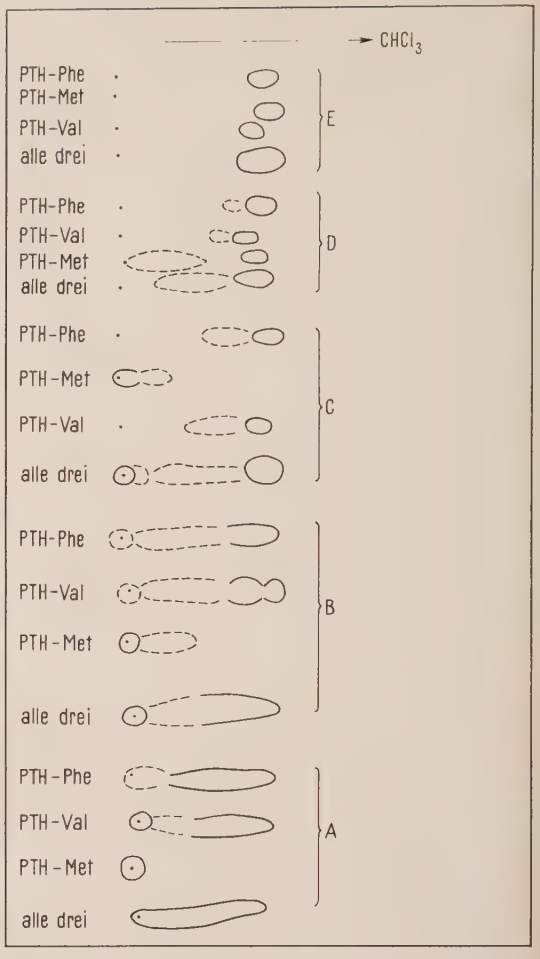


Fig. 7. Oxydation der PTH-Aminosäuren (je 1 μg) der «Methioningruppe» durch zunehmende Mengen H_2O_2 für sich allein und in Mischungen (vgl. Text). E = Vergleich ohne H_2O_2. Laufstrecke 10 cm.

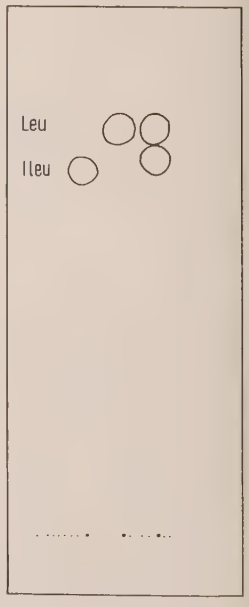


Fig. 8. Durchlauf-Chromatogramm im System Nr. 10 zur Trennung von Leu und Ileu (5 h, je 1 μg Leu und Ileu). Laufstrecke von Leu 10 cm.

gleichzeitig laufen lassen kann, trennen 14 von den 19 PTH-Aminosäuren der Tabelle IV. Mit Hilfe einer einfachen Oxydationstechnik (Fig. 7) und durch saure Hydrolyse mit anschliessender dünnschichtchromatographischer Identifizierung der freigesetzten Aminosäure, die hier in jedem Fall hydrolysebeständig ist, werden die noch fehlenden 5 Substanzen mit wenig zusätzlichem Aufwand ebenfalls nachweisbar (Fig. 8 und [24]). Zum Sichtbarmachen der PTH-Aminosäuren bewährt sich ein modifizierter Chlor-Tolidin-Test; die Erfassungsgrenze liegt bei etwa $3 \cdot 10^{-4}\,\mu M$, das heisst zum Beispiel bei 0,05 μg PTH-Pro (!).

Summary. Methods for the identification of DNP- and PTH-amino acids are improved by application of thin-layer chromatography using Kieselgel G. The advantages over paperchromatography are better resolution, increased sensitivity and time-saving.

Cell Metabolism and Virus[1]

By E. Kovács[2]

Viral infection is a cellular phenomenon. The virus, as a particle of macromolecular organization – or one part of it, the nucleic acid moiety – adsorbed on the external barrier of the cell, penetrates into it, takes over command of various physiological functions and determines or provocates its own reproduction by the host-cell. Thus, one might assume *a priori* a profound alteration, almost a metamorphosis of the cellular metabolism as the consequence of infection *with* and biosynthesis *of* the virus. As a matter of fact, experimental data accumulated up-to-date support the rightness of such ideas[3,4], in spite of many difficulties for the technical approach. For instance, up to about the last one and half decades, living experimental animals were almost exclusively used, which fact means a heterogeneous cell population regarding morphology and function, or viral sensitivity. With the use of chorio-allantoic membranes (CAM) of embryonated eggs[5], and later the tissue cultures of mammalian cells, for virus research[6], it became possible to study the sequence of events at the cellular level, also in viral diseases of animals. By this way, our actual concept of Virology was born: a biochemical and molecular one, quite different from the orthodox, bacteriological, and microbiological ideology. Thus the virus disease is a novel chapter of the Cell Physiology and Cell Pathology; 'a chemical infection' caused by invading *macromolecules*.

After this preamble, we want to limit this broad subject almost exclusively to the discussion of data regarding the metabolism of mammalian cells. Especially findings obtained in cultivated cells will be reviewed for the characteristic alterations caused by various viruses. Two great categories will be excluded from the beginning, namely that of the bacteriophage and plant viruses. These limitations allow us to list in this relation pertinent findings with the animal viruses, including human ones. However, this domain is so extremely rich, that only the most important experimental facts can be presented and discussed.

Cell respiration and virus. From the historical angle, we quote experiments intended to demonstrate, without success, changes in O_2 consumption of brain slices derived from animals infected with poliomyelitis virus[7]. On the other hand, a slight increase of respiration was described in western equine encephalitis virus infected tissue cultures[8]. However, brain homogenates of mice paralyzed with human or murine poliomyelitis did not differ from the normal controls regarding respiration[9,10]. Later Parodi[11] and others[12–14] observed, with more refined special techniques, an increase, respectively the decrease of oxygen consump-

[1] On the basis of a relation presented at the Symposium. *The Effect of Corticosteroides on Viral Infection.* Symp. Soc. ital. Stud. Malatt. infett. parasit., Sta. Margherita Ligure, June 11/12, 1960. G. Malatt. infett. parasit. (in italian), in press.

[2] Deutsche Forschungsanstalt für Psychiatrie (Max-Planck-Institut), Abteilung für Serologie und Mikrobiologie, München (Germany).

[3] C. Hannoun, in J. A. Thomas, *Exposés actuels de biologie cellulaire: Mécanismes d'autoreproduction* (Masson & Cie, Edit., Paris 1957), p. 363.

[4] R. Koppelmann and E. A. Evans, Jr., Progr. Med. Virol. *2*, 73 (1959).

[5] G. J. Buddingh, in T. M. Rivers and F. L. Horsfall, *Viral and Rickettsial Infections of Man*, 3rd Edition (Lippincott Co., Philadelphia 1959), p. 199.

[6] J. D. Ross and J. T. Syverton, Ann. Rev. Microbiol. *11*, 439 (1957).

[7] M. Brodie and S. B. Wortis, Arch. Neurol. Psychiat. *32*, 1159 (1934).

[8] H. Zinsser and E. B. Schoenbach, J. exp. Med. *66*, 207 (1937).

[9] E. Racker and H. Kabat, J. exp. Med. *76*, 579 (1942).

[10] A. E. Pearson and R. J. Winzler, J. biol. Chem. *181*, 577 (1949).

[11] A. S. Parodi, J. Immunol. *58*, 109 (1948).

[12] W. F. MacLimans, R. A. Siem, B. C. Mark, and E. Pinska, J. Immunol. *64*, 475 (1950).

[13] R. A. Siem, B. C. Smith, and W. F. MacLimans, Science *112*, 505 (1950).

[14] E. Kun and M. H. D. Smith, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *73*, 628 (1950).

tion in fowls eggs inoculated with the virus of influenza, WEE, and Newcastle Disease, but no change with mixoma virus[14]. More recently, the group of SYVERTON investigated systematically this problem in HeLa cell cultures[15–17]. They did not find significant differences between those infected with poliovirus and the non-infected cells, so long as drastic morphological changes did not occur. In contrast to earlier work[16], these authors recently described the propagation of poliovirus under anaerobic conditions[17], although the latent period became somewhat prolonged. The results of DEKEGEL[18], however, are at variance with the above findings, although obtained under not comparable circumstances. Other works also emphasize the importance of oxidative energetic processes, employing different techniques and host-virus systems[19–22]. With the use of 2,4-Dinitrophenol (DNP) THOMPSON[23] and later ACKERMANN et al.[24] revealed the dependence of virus production on the oxidative phosphorylation in connection with vaccinia infected Maitland Type tissue cultures, and influenza infection of CAM *in vitro*. Similary GIFFORD et al. claimed more recently greatly reduced yield of poliovirus in HeLa cells treated with non-toxic doses of DNP[25]. In conclusion, we may say, that there is large variation in experimental results obtained by different systems regarding the gas exchange of virus infected cells. However, in general *the normal respiratory quotient of the cell suffice* for the biosynthesis of a virus. The alterations of respiration are perhaps of secondary nature, due to morphological changes of degenerative character. This was evidenced by the classical experiments of HOWE et al.[26] on the cytochromeoxidase and succinic dehydrogenase of anterior horn neurons in monkeys paralyzed following experimental poliomyelitis infection. Similar works should be repeated in tissue culture, where the sequence of the pathological and biochemical changes could perhaps be followed with less difficulty.

Glucose utilization in infected cells. This is a very intensively worked field of cell biochemistry and pathology, but the literature shows many contradictory results. The experiments of RACKER et al.[27,28] will be more extensively quoted; first of all because they illustrate the hidden difficulties of such work and for the possible theoretical significance of their findings. RACKER et al.[27] have observed the diminution of glycolysis in brain homogenates of mice infected with murine or human poliovirus (of Theiler's respectively Lansing strains). Such homogenates proved inhibitory to glycolysis also, when added to normal cell suspensions[28]. After time consuming laborious work, a complicated biochemical mechanism was revealed: a typical example of pathological changes on the molecular level. One abnormally high iron content of the infected homogenates was detected[29] which enhanced some proteolytic enzymes. This Cathepsin-type of biocatalyst, on the other hand, destroyed the hexosediphosphate-dehydrogenase, disturbing in this way the regeneration of ATP, thus *interferring* with the normal functioning of the glycolytic cycle. We have to say at once that perhaps here also it is a secondary phenomenon revealed and the experimental set-up was not adequate to discover the basic cause, but only the vitious circle of the metabolism. Hence it remained the privilege of other, especially tissue-culture workers to demonstrate the initial increase of glycolysis in a very early stage of the infection, as evidenced by decrease of glucose concentration or enhanced lactic acid production[14,30–33]. It seems that the glucose is the fuel of the virus synthesis[18,34]. However, the production of influenza virus in cells maintained on simple physiological salt mixture (Tyrode's solution), containing low concentrations of glucose[35], and that of poliovirus on salt solution alone[36,37], or only with 0.5 g/l glucose[38], substantiate the conclusion that the intracellular stock of nutrients suffice for virus reproduction in certain cases.

Toxic metabolites and other inhibiting substances may interfere with various phases of the glycolytic cycle[29,31,39]. It is pertinent to quote the claim of ISAACS[40] on the hyper-glycolytic effect of the 'interferon', a not fully defined biological product of virus-

[15] G. E. GIFFORD, H. E. ROBERTSON, and J. T. SYVERTON, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *86*, 515 (1954).
[16] G. E. GIFFORD, H. E. ROBERTSON, and J. T. SYVERTON, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *93*, 321 (1956).
[17] G. E. GIFFORD and J. T. SYVERTON, Virology *4*, 216 (1957).
[18] D. DEKEGEL, Acta virologica *3*, 27 (1959).
[19] J. W. MOULDER, B. R. MCCORMACK, and M. K. ITATANI, J. infect. Dis. *93*, 140 (1953).
[20] M. I. SELLERS and G. J. JANN, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *86*, 205 (1951).
[21] M. I. SELLERS, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *91*, 457 (1956).
[22] J. W. MOULDER and E. WEISS, J. infect. Dis. *88*, 68 (1951).
[23] R. L. THOMPSON, J. Immunol. *55*, 345 (1947).
[24] W. W. ACKERMANN and R. B. JOHNSON, J. exp. Med. *97*, 315 (1953).
[25] G. E. GIFFORD and B. R. BLAKEY, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *102*, 268 (1959).
[26] H. A. HOWE, in J. G. KIDD, *The Pathogenesis and Pathology of Viral Diseases*. A Symposium of the New York Academy of Medicine (Columbia University Press, New York 1950), p. 214.
[27] E. RACKER and F. KRIMSKY, J. exp. Med. *84*, 191 (1946).
[28] E. RACKER, *Metabolism of Infected Cells* (Academic Press, Inc., New York 1954), p. 138.
[29] E. RACKER and I. KRIMSKY, J. exp. Med. *85*, 715 (1947).
[30] H. B. LEVY and S. BARON, Nature *178*, 1230 (1956).
[31] H. B. LEVY and S. BARON, J. infect. Dis. *100*, 109 (1957).
[32] J. BECKER, N. GROSSOWICZ, and H. BERNKOPF, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *97*, 77 (1958).
[33] E. KUN, J. E. AYLING, and B. V. SIEGEL, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. *46*, 622 (1960).
[34] H. EAGLE and K. HABEL, J. exp. Med. *114*, 271 (1956).
[35] M. M. BURR, M. E. CAMPBELL, J. F. MORGAN, and F. P. NAGLER, Canad. J. Microbiol. *1*, 158 (1954).
[36] J. C. N. WESTWOOD, Brit. med. Bull. *15*, 181 (1959).
[37] H. T. ZWARTOUW, D. TAYLOR-ROBINSON, and J. C. N. WESTWOOD, Virology *10*, 393 (1960).
[38] E. KOVÁCS and V. STÜRTZ, Z. Naturf. *15b*, 238 (1960).
[39] D. MATZELT, J. HORMANN, and H. LENNARTZ, Biochem. Z. *330*, 260 (1958).
[40] A. ISAACS, Virology *10*, 144 (1960).

host interaction[41], claimed to be the cause of interference with influenza virus infection. In concluding our discussion, it is sufficient to say that certain chemicals, for instance certain antiglycolytic substances, suppress the biosynthesis of various viruses[18, 23, 42–44]. Unfortunately, the practical application of this theoretical approach is frustated by many factors actually not within the grasp of clinical medicine, although encouraging experimental results were reported recently[41].

Krebs-cycle and viral infection. Thus the normal functioning of the tricarboxylic cycle of the host cell is necessary for virus propagation. This is almost an axiome of modern Virology, as demonstrated by many workers in different systems[42–48]. As a matter of fact, inhibitors of the Krebs-cycle reduce the multiplication of influenza, polio, mumps, EEM, PVM, virus extensively, *in vitro* and partly *in vivo* experiments also. The viruses so far investigated *do not possess Krebs-cycle or other metabolic enzymes*, thus the above fact may be additional strong evidence for the complete *metabolic dependence* of the virus on the biochemical organization of the host-cell. Being, however, of highly cytotoxic nature, these inhibitors were not yet successfully applied in clinical or veterinary medicine.

Lipid metabolism of virus infected cells. The metabolism of fats in connection with virus infections was investigated only recently, general attention being orientated towards other sectors, e.g. the carbohydrate utilization. Biochemical analyses, and especially radiophosphorus studies, demonstrated the marked enhancement of the turnover rate of the lipidic fraction of cells infected with GD VII strain of murine poliovirus[49] or with human poliovirus[50, 51]. We might take these findings as the indication of a general activation of the cell-metabolism and may be not of a specific nature, because the above viruses do not contain lipids as integral structural constituents, at least in their final mature forms[52]. However, infections with other lipid containing viruses (e.g. lipoid membranes) should be more intensively studied from this angle[53]. We might justly conclude that the fat metabolism may also be activated in virus-infected cells and the lipids may be utilized as a source of energy or as building stones for the virus particles.

Inorganic salts in infected cells. We mentioned before the enzymatic anomalies caused by increased iron concentrations in nerve tissue of mice infected with Theiler virus[28, 29]. Other results on record regard changes in inorganic phosphorus concentrations[32, 54, 55] magnesium[56] and, naturally, potassium and sodium [57–59], the much preferred ions of physiologists[59]. The primary nature of these alterations, however, is open to question, because the intra- and extra-cellular concentration of such ions is the function of permeability of the cell membrane to inorganic salts: in other words, it depends on the active and passive transport of such elements. These factors, on the other hand, govern the hydration state of the colloids and macromolecules, which form complexes with the various anions[59, 60]. An important feature has to be discussed in spite of the limitation of space: namely, the rôle of bicarbonate. The presence of this salt seems to be an essential factor not only for the physiology of cultivated cells, but for the biosynthesis of various particles, such as herpes, polio- and Coxsackie viruses[61]. The opinion of CHANG, who stipulates the precursor rôle of bicarbonate in nucleic acid synthesis, and not merely a regulator of the Hydrogen ion concentration of the internal 'Milieu' of the cells[59, 60] will be discussed later. Similarly, the inhibitor or activator effect of some metabolic ions, and of trace elements in general, is deeply connected with the physiological function of various enzyme systems. However, as was recently showed by KOVÁCS et al.[38], poliovirus propagation may take place even in media *lacking* inorganic salts, with the exception of bicarbonate. The inoculum however has to be suspended in complete media, containing inorganic ions. In isotonic sucrose alone, the virus will not be adsorbed to the cells[62], because the process requires optimum Calcium and Magnesium concentrations[63], a fact more extensively studied in

[41] A. ISAACS, Proc. 5th Internat. Poliomyelitis Conference, Kopenhagen, July 26–28, 1960 (Excerpta Medica Foundation, Amsterdam), p. 37.
[42] W. W. ACKERMANN, J. biol. Chem. *189*, 421 (1951).
[43] T. WATANABE, R. B. HIGGINBOTHOM, and I. P. GEBHARDT, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *80*, 758 (1952).
[44] T. FRANCIS, G. C. BROWN, and A. KANDEL, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *85*, 83 (1954).
[45] W. J. MOGABGAB and F. L. HORSFALL, J. exp. Med. *96*, 531 (1952).
[46] W. W. ACKERMANN, E. KLEINSCHMIDT, and H. KURTZ, J. exp. Med. *93*, 635 (1951).
[47] T. N. FISHER and H. S. GINSBERG, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *95*, 47 (1957).
[48] H. B. LEVY, W. P. ROWE, L. F. SNELLBAKER, and J. W. HARTLEY, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *96*, 732 (1957).
[49] K. MOLDAVE, J. biol. Chem. *210*, 343 (1954).
[50] G. MIROFF, W. E. CORNATZER, and R. G. FISHER, J. biol. Chem. *228*, 255 (1957).
[51] G. CONTRERAS, J. TOBA, and A. OHLBAUM, Biochim. biophys. Acta *35*, 268 (1959).
[52] R. W. HORNE and J. NAGINGTON, J. Mol. Biol. *1*, 333 (1959).
[53] W. WECKER and W. SCHÄFER, Z. Naturf. *12b*, 415 (1957).
[54] S. A. ZAHLER, J. infect. Dis. *93*, 150 (1953).
[55] P. D. COOPER, J. gen. Microbiol. *17*, 335 (1957).
[56] D. J. BAUER, in P. FILDES and W. E. VAN HEYSINGEN, *The Nature of Virus Multiplication* (The University Press, Cambridge 1953), p. 65.
[57] A. S. LEVINE, P. H. BOND, A. R. SCALA, and M. D. EATON, J. Immunol. *76*, 386 (1956).
[58] G. GIORDANO and E. TURRISI, Boll. Soc. ital. Biol. sperim. *34*, 970 (1958).
[59] H. NETTER, *Theoretische Biochemie* (Springer-Verlag, Berlin 1959), p. 58, 118.
[60] L. VON BERTALANFFY, *Theoretische Biologie* (Deuticke, Wien 1953), p. 122.
[61] S. CHANG, J. exp. Med. *109*, 229 (1959).
[62] L. C. MCLAREN, J. J. HOLLAND, and J. T. SYVERTON, J. exp. Med. *109*, 475 (1959).
[63] J. G. BACHTHOLD, H. C. BUBEL, and L. P. GEBHARDT, Virology *4*, 582 (1957).

connection with bacteriophage[64]. On the other hand, the virus already penetrated into the cell may determine its own reduplication *even if the external medium is lacking in salts or nutrients*. This is a conclusion which has to be underlined, because it is another solid argument in favour of the *autarchy* of the host-cell during the biosynthesis of the virus.

Metabolism of nucleic acid of virus infected cells. Abnormalities of general cell activities were listed in the preceding sections, which are more the signs than the essence of the primary pathology. With the study of nucleic acid changes, however, we reach the real cause of the alterations mentioned before: namely, the invasion of a cell by a specific type of macromolecule, which is not, or need not be, too different from the host material. This fact enables the cell to resynthetize it on the order, or on the *cytochemical stimulation* of the newly emerged 'model' substance. Now enough experimental evidence has been accumulated proving the identity of the genetic material with the infectious nucleic acid of various viruses[65–78]. Thus the metabolic studies of nucleic acids during virus infection are of capital importance. This is further emphasized by the rôle assigned to nucleic acids (especially RNA) in protein biosynthesis in general and the protein moiety of the virus in particular. The latter determines the physical form, shape, and serological specificity of a virus[79]. Thus protein metabolism has also to be understood and recapitulated briefly in order to draw an integrated picture of the behaviour of host-cells following infection with virus.

The 'classical' genetic material, the DNA seems to possess more physicochemical and biological stability than the RNA, at least during the interphase of the mitotic cycle or in nondividing cells. However, as we shall see in connection with DNA containing viruses, the general behaviour of this nucleic acid may be similar to that of the RNA. Many experimental results are available showing a quantitative decrease of RNA concentration in organs of animals infected with various viruses. For instance, Sourander demonstrated the decrease of RNA by ultraspectrophotometric techniques in spinal ganglions of chick embryos infected with rabbic virus[80]. This reduction occurred long before any inflammatory reaction; thus it may reflect a primary host-virus interaction. Others[81–83], by similar methods, were able to reveal increase in nuclear or cytoplasmic nucleic acids at an early stage of the infection. Thus, we may conclude, especially on grounds of the biophysical and biochemical investigations of the group of Ackermann of Ann Arbor[84,85], that the virus multiplication is preceded by a highly increased RNA, necessary for the biosynthesis of the virus and host nucleic acid, or nucleo-protein. With the progression of the infection with poliovirus, *in vitro*, or polioencephalomyelitis virus, *in vivo*, the RNA concentration decreases to levels below those of the normal controls[86,87] or remains constant in others[88,89]. This descripton, however, is an over-simplification, because others demonstrated large periodical fluctuations in the RNA and protein levels of non-infected HeLa cells, which findings cast much doubt on some of the above results[90–92]. Furthermore, there are additional data revealing a subnormal incorporation of P^{32} into the DNA of HeLa cells infected with poliovirus[86]. There is more agreement in the 'turnover' studies regarding the incorporation of radioactive phosphorus in the RNA of infected cells[48,54,84–86,89,90]. Technical difficulties inherent in biological assays may be responsible for the discrepancies, even in less complex experimental set-ups, such as tissue cultures. The drop of RNA of cortisone-treated and influenza virus-infected CAM was described years ago by Womack et al.[93], but all these works have to be repeated with more refined techniques.

Ginsberg et al.[94] confirmed the increase of DNA during adenovirus infection, and other workers did

[64] L. J. Tolmach, Adv. Virus Res. *4*, 63 (1957).
[65] A. Gierer and G. Schramm, Z. Naturf. *11b*, 138 (1956).
[66] J. S. Colter, H. H. Bird, and R. A. Brown, Nature *179*, 859 (1957).
[67] J. S. Colter, H. H. Bird, A. W. Moyer, and R. A. Brown, Virology *4*, 522 (1957).
[68] H. E. Alexander, G. Koch, M. M. Mountain, K. Sprunt, and G. V. Demme, Virology *5*, 172 (1958).
[69] W. Liebenow and D. Schmidt, Acta virologica *3*, 168 (1959).
[70] E. Wecker, Z. Naturf. *14b*, 370 (1959).
[71] P. Cheng, Nature *181*, 1800 (1958).
[72] J. Huppert and F. K. Sanders, Nature *182*, 515 (1958).
[73] F. Sokol, H. Lisikova, and J. Zemla, Acta virologica *4*, 65 (1960).
[74] R. Protocala, V. Boeru, and J. Samnel, Acta virologica *3*, 172 (1959).
[75] H. F. Maassab, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. *45*, 877 (1959).
[76] J. J. Holland, L. C. McLaren, and J. T. Sylverton, J. exp. Med. *110*, 65 (1959).
[77] C. Sprunt, W. M. Redman, and H. E. Alexander, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *101*, 604 (1959).
[78] F. Brown, R. F. Sellers, and D. L. Stewart, Nature *182*, 535 (1958); Virology *7*, 408 (1959).
[79] F. M. Burnet and W. M. Stanley, in *The Viruses*, Vol. I (Academic Press Inc., New York 1959), p. 1.
[80] P. Sourander, Acta pathol. microbiol. scand, Suppl. *96*, 1 (1955).
[81] T. O. Casperson, Cell Growth and Cell Function, a Cytochemical Study (Publ. Norton and Co., New York 1950).
[82] H. Hydén, Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. *12*, 104 (1945).
[83] W. Sandritter and M. Berg, Z. Naturf. *14b*, 379 (1959).
[84] H. F. Maassab, P. C. Loh, and W. W. Ackermann, J. exp. Med. *106*, 641 (1957).
[85] W. W. Ackermann, P. C. Loh, and F. E. Payne, Virology *7*, 171 (1959).
[86] H. Goldfine, R. Koppelmann, and E. A. Evans, Jr., J. biol. Chem. *232*, 577 (1958).
[87] F. Gollan and C. P. Barnum, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *69*, 34 (1946).
[88] E. L. Rothstein and L. A. Manson, Virology *9*, 141 (1959).
[89] H. B. Levy and L. F. Snellbaker, J. infect. Dis. *98*, 270 (1956).
[90] N. P. Salzman, Biochim. biophys. Acta *30*, 158 (1959).
[91] N. P. Salzman, R. J. Lockart, Jr., and E. D. Sebring, Virology *9*, 244 (1959).
[92] N. P. Salzman and E. D. Sebring, Arch. Biochem. Biophys. *84*, 143 (1959).
[93] C. R. Womack and E. H. Kass, J. Immunol. *71*, 152 (1953).
[94] H. S. Ginsberg and M. K. Dixon, J. exp. Med. *109*, 407 (1959).

the same with polyhedrosis virus of insects[95]. These observations bear some analogies with the above findings[85,86] because they demonstrate DNA-increase of the host-cell in infections with DNA viruses[94–99].

Besides quantitative differences in nucleic acid and protein content between non-infected and infected cells, there have been many attempts to demonstrate qualitative differences between the viral and host nucleic acids. *In vivo* experiments of SIEGEL and KUUSI[100] with MEF-I strain of poliovirus, and those of ADA and PERRY[101] with influenza, REDDI[102] with plant viruses, or SCHWERDT et al. using crystalline poliovirus, did reveal variations between different virus strains[102], or host and virus NA[103]. However, the striking differences found by WYATT and COHEN[104] with the discovery of 5-methylcytosine in *E. coli* phage were not yet reduplicated in other sections of Virology. Even the above findings need confirmation in view of the marked heterogenity of cellular RNA from various sources, or regarding purine and pyrimidine ratios[105–107], which may depend upon the functional state of the cells. We ignore the mechanism of polynucleotide-synthesis in infected animal cells; notwithstanding, phosphorylases analogous to those isolated by the group of OCHOA[108] and KORNBERG are present also in animal cells[109,110] and the effect of phage infection on bacterial phosphorylases was studied by BESSMAN[111].

The influence of depolymerization of nucleic acids on virus propagation was studied by pretreatment of the cells with crystalline RNAse, prior to infection. The enzyme enters the cells and degrades cellular RNA[112] so that at the time of the subsequent inoculation with virus there may be a diminished concentration of highly polymerized RNA available intracellularly. LECLERC found in CAM, prepared as said before, a blockage of influenza virus multiplication. It seems that the presence of cellular macromolecular RNA is necessary for virus production[113,114]. Similar but less suggestive results were obtained by BARSKI with poliovirus in Rhesus kidney cells[115].

Aspects of the protein metabolism and virus infection. Any classification in a period of transition has its pitfalls. Therefore it may be possible that protein metabolism is more important for virus production than is supposed nowadays, or it may be at least of equal biological importance with that of the nucleic acids, which stands in the focus of today's experimental and theoretical research. There may be time-sequence differences also. It seems that the infection is transmitted by the nucleic acid part. However, by this induction mainly complete virus will be produced, unless the 'normal' cycle of reproduction is not interferred with. Finally there are *experimental* results[72,116] showing a simultaneous presence or production of infectious NA and virus particles. Thus the protein metabolism has its significance and needs at least equal attention to that of the NA. As a matter of fact, many of the writers quoted above[85,94] demonstrated increased protein synthesis in an early stage of virus infection *in vitro*. However, contrasting findings were reported by LEVY et al.[30,31] and the criticism of SALZMAN[90–92] is valid for this field also. Therefore, no definite assessment of this problem can yet be made. It seems that, in contrast to the nucleic acid synthesis, the intracellular 'metabolic' pool of amino acids and that of the medium can also be utilized for the *de novo* production of virus proteins[117]. Protein synthesis and turnover are inhibited after $^1/_2$ to 2 h of infection[118]. The mechanism may not differ from the physiological one, which process has been reviewed recently by various workers[119–124]. The problem of amino acid activation, and their attachment to the polynucleotides-chain in terminal position, seems to be the mechanism of nucleoprotein synthesis[124,125], but these questions were not investigated in connection with viral diseases.

[95] K. YAMAFUJI, M. SHIMAMURA, and F. JOSHIHARA, Enzymologia *16*, 337 (1954).
[96] M. REISSIG and A. S. KAPLAN, Virology *11*, 1 (1960).
[97] A. S. KAPLAN and T. BEN-PORAT, Virology *11*, 12 (1960).
[98] N. P. SALZMAN, Virology *10*, 150 (1960).
[99] W. E. MAGEE, M. R. SHEEK, and M. J. BURROUS, Virology *11*, 296 (1960).
[100] B. V. SIEGEL and T. K. KUUSI, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *89*, 305 (1955).
[101] G. L. ADA and B. T. PERRY, J. gen. Microbiol. *14*, 623 (1956).
[102] K. K. REDDI, Biochim. biophys. Acta *32*, 386 (1957).
[103] F. L. SCHAFFER, H. F. MOORE, and C. E. SCHWERDT, Virology *10*, 530 (1960).
[104] G. R. WYATT and S. S. COHEN, Biochem. J. *55*, 774 (1953).
[105] G. DE LAMIRANDE, C. ALLARD, and A. CANTERO, J. biophys. biochem. Cytol. *6*, 291 (1959).
[106] E. CHARGAFF, Fed. Proc. *10*, 654 (1959).
[107] D. ELSON, L. W. TRENT, and E. CHARGAFF, Biochim. biophys. Acta *17*, 362 (1955).
[108] M. GRUNBERG-MASNAGO, P. J. ORTIZ, and S. OCHOA, Biochim. biophys. Acta *20*, 269 (1956).
[109] M. J. BESSMANN, I. R. LEHMAN, E. S. SIMMS, and A. KORNBERG, J. biol. Chem. *233*, 171 (1958).
[110] F. J. BOLLUM, Ann. N. Y. Acad. Sci. *81*, 792 (1959).
[111] M. J. BESSMANN, J. biol. Chem. *234*, 2735 (1959).
[112] V. N. SHUMAKER, Exp. Cell Res. *15*, 314 (1958).
[113] J. LE CLERC, Nature *177*, 578 (1956).
[114] J. LE CLERC, Ann. Inst. Pasteur *93*, 772 (1957).
[115] G. BARSKI and F. CORNEFERT, Ann. Inst. Pasteur *91*, 810 (1956).
[116] F. K. SANDERS, Nature *185*, 802 (1960).
[117] J. E. DARNELL, H. EAGLE, and T. SAWYER, J. exp. Med. *110*, 445 (1959).
[118] J. E. DARNELL, JR., and L. LEVINTOW, J. biol. Chem. *235*, 74 (1960).
[119] D. B. COWIE and F. T. MCCLARE, Biochim. biophys. Acta *31*, 236 (1959).
[120] J. BRACHET, *Biochemical Cytology* (Academic Press, Inc., New York 1957), p. 226.
[121] H. CHANTRENNE, in P. FILDES and W. E. VAN HEYSINGEN, *The Nature of Virus Multiplication*, Symp. Soc. gen. Microbiol. (The University Press, Cambridge 1953), p. 1.
[122] S. S. COHEN, in F. M. BURNET and W. M. STANLEY, *The Viruses* (Academic Press, Inc., New York 1959), p. 15.
[123] G. TURNEVAL, *Recent Progress in Microbiology*, Symp. II (Almqvist and Wiksell, Stockholm 1959), p. 78.
[124] E. S. CANNELAKIS, Ann. N.Y. Acad. Sci. *81*, 675 (1959).
[125] E. HERBERT, Ann. N.Y. Acad. Sci. *81*, 679 (1959).

In this section, we may quote the work of KILBOURNE[126,127] on the effect of cortisone, this strong protein-catabolic steroid, which may act through the carbohydrate metabolism of the cells[128]. The auto-interference of the infective particles, an explanation offered by this author for the diminished virus production under the influence of cortisone, calls for a biochemical interpretation. The exact evaluation of the point of attack of the hormone in these particular cases, needs further investigation.

Enzyme-changes in cells infected with animal viruses. The reasons for treating this subject in a separate chapter are various. First of all, although so many intracellular enzymes are known, their exact rôle in the metabolism of the cells is not always clear. Nevertheless, the importance of biocatalysts in the biosynthesis of the virus is so great that it may be said, in analogy with the claim of VAN POTTER[129] regarding cell biology and the cancer field, that the great majority of the phenomena observed in virus-host interaction are due to enzymic processes. The virus in general being devoid of metabolic enzymes[56], it depends on the biocatalytic activities of the host cells. Thus the study of changes in these systems during virus infection is fully justified. Finally, being especially interested in the field, one may take the occasion to recapitulate briefly personal contribution, and ideas which may be helpful for a classification and stimulating in pursuing this laborious experimental approach.

First of all, we should like to speak of the work of DERITIS and his group[130–132], who demonstrated the decreased activity of some enzymes, especially of transaminases of the liver in mice infected with hepatitis virus and an increase of this and other enzymes in the plasma due to the alterations of the liver cells. These changes occurred a few hours after systemic infection; thus before secondary (inflammatory) reaction had occurred. Therefore some of their findings may reflect a basic phenomenon, namely the primary interaction between liver cell and virus.

We ourselves working on clinical material between 1949 and 1954, found in the cerebrospinal fluid (CSF) an increased RNase activity, the absence of DNase and the inhibition of crystalline pancreatic DNase with CSF of paralytic poliomyelitis patients[133,134]. This inhibition was reproduced later with infected tissue culture fluid, suggesting the presence of a *toxic factor*, described for the first time in connection with this infection[135–137]. This observation was extended to other biocatalysts and interpreted as a toxic action, derived from the cell metabolism vitiated by the virus, or a direct effect of the distorted viral macromolecules on intracellular enzyme systems *in situ*[138–142]. A series of papers published between 1954 and 1960 described the various aspects of an irreversible transformation of the enzymic activities of the host cell[143–147]. This process leads through an initial stimulation of nucleolytic enzymes to the destruction of the microcosmic harmony of the cell. The kinetics of the enzymes goes through maxima and minima, and recently we were able to demonstrate, with some microsomal (glucose-6-phosphatase), lysosomal or mitochondrial and nucleolar biocatalysts (RNases)[148], a very early activation period[149]. This is perhaps the first biochemical sign of the infection in a preparative phase of the biosynthesis of infective particles (Fig. 1 and 2). This stimulation was detected in some instances within 30 min after the first contact of HeLa cells with poliomyelitis virus (Fig. 2). In contrast with this, some of the biocatalytic functions may be inhibited or unchanged[149] at the same time, causing an imbalance in the physiology of the cell. The above observations are in agreement with the findings of others in connection with different other viruses[150,151].

Effect of the 'milieu' on virus infection. The influence of environmental medium and temperature on cellular metabolism, or the infection with virus, has been extensively studied. The reaction of the internal milieu in the great majority of animal cells, is around neutrality[59,60]. The optimum of the metabolism is near to this pH, and one may affirm, speaking mainly about cultivated cells or living animals, the constancy of the internal milieu[59,60]. As a matter of fact, only

126 E. D. KILBOURNE, J. Immunol. *74*, 57 (1955).
127 E. D. KILBOURNE, J. exp. Med. *106*, 851 (1957).
128 E. BIANCHINI, in *Cortisonici nelle malattie virali*, Symp. Soc. ital. Stud. Malatt. infett. parasit., Sta Margherita Ligure, June 11/12 1960. G. Malatt. infett. parasit., in press.
129 R. v. POTTER, *Enzymes, Growth and Cancer* (C. C. Thomas, Springfield 1950), p. 4.
130 F. DE RITIS, in Proc. Congr. Patol. Infett., Milano, 6–10 Maggio 1959, Vol. I, p. 6 (Ediz. Minerva Medica, Torino 1959).
131 F. DE RITIS, M. COLTORTI, and G. GIUSTI, Relazione VII Congresso Infett. e Parass., Torino, 9 dicembre 1955 (Ediz. Minerva Medica).
132 F. DE RITIS, *Enzimi e malattie infettive*. Relazione al Simposio Internazionale *Enzimi in Medicina*, Torino, 7–8 giugno (1957).
133 E. KOVÁCS, J. Pediatrics *46*, 691 (1955).
134 E. KOVÁCS, J. Pediatrics *45*, 569 (1954).
135 E. KOVÁCS, Proc. Can. Physiol. Soc., London (Ont.), October 22–23 (1955), p. 36.
136 E. KOVÁCS, Z. Naturf. *13b*, 34 (1958).
137 E. KOVÁCS, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y. *92*, 83 (1651).
138 E. KOVÁCS, J. exp. Pathol. *104*, 589 (1956).
139 E. KOVÁCS, Minerva Med. *48*, 2157 (1957).
140 E. KOVÁCS, G. Malatt. infett. parasit. *10*, 1 (1958).
141 E. KOVÁCS, Biochem. Z. *330*, 113 (1958).
142 E. KOVÁCS, Naturwissenschaften *45*, 91 (1957).
143 E. KOVÁCS, Naturwissenschaften *44*, 520 (1958).
144 E. KOVÁCS, Exper. *13*, 481 (1957).
145 E. KOVÁCS, Exper. *14*, 295 (1958).
146 E. KOVÁCS and D. WULFF, Proc. IV. Internat. Congr. Biochem. Vienna, September 1958 (Edition Pergamon Press, London), p. 71.
147 E. KOVÁCS, Proc. II. Internat. Conf. Infect. Pathol., Milan, May 10, 1959 (Publs. Minerva Medica), Vol. 2, in press.
148 E. KOVÁCS, V. STÜRTZ, and G. WAGNER, Z. Naturf. *15b*, 116 (1960).
149 E. KOVÁCS, G. WAGNER, and V. STÜRTZ, Z. Naturf. *15b*, 506 (1960).
150 D. J. BAUER, Brit. J. exp. Path. *28*, 440 (1947).
151 O. KLAMERTH, Z. Naturf. *14*, 76 (1959).

drastic changes of the pH influence the virus production[38], perhaps through altered cell metabolism. It is known, for instance, that below pH 6 there is no poliovirus synthesis in HeLa cells[16] or in hyperalcaline or acid medium, variants and mutants of the virus are generated[152]. However, it seems to us that the optimal intracellular hydrogen-ion concentration is far from the optimum for isolated, purified, concentrated, or crystallized enzymes *in vitro*. The exact explanation of this discrepancy is not known at the present time.

The effect of under- and over-optimal temperature on virus infection interested many research workers. This physical environmental factor may exert its influence through the kinetics of various enzyme systems which are temperature-dependent, and, in this way, indirectly, through the metabolism of the cell. In animals, the body temperature is regulated by hormon-governed processes, first of all by thyroxine. Thus the effect of various endocrine factors was intensively studied in connection with viral infection[153]. The influence of hibernation caused by hypothermia (and drugs) was explored by CRISALLI[154]. The hopes attached to similar approach were not realized, because the animals in general were protected while hibernating, but when returned to normal temperatures, the virosis followed its usual course. *In vitro* assays indicate that moderate hyperthermia increases the virus yield[155], high fever counters it[156], while hypothermia delays the liberation of poliovirus into the supernatant fluid; at 4°C there is no virus synthesis[157]. For the thermolabile non-neurotrop poliovirus see the excellent review of LWOFF[156]. Similar findings were reported with other viruses also[158]. The phenomenon of synchronization of the mitosis by intermittent temperatures, well known in bacteriology, may prove the interdependence of cellular metabolism and optimal temperature. Unfortunately, similar experiments are more difficult with adult animal cells[159]; thus no successful application to virological problems has yet been reported.

Discussions and conclusions. Summarizing the experimental data, the following biochemical concept could be delineated to explain the effect of virus on various functions of the cell and, above all, on its metabolism. The virus is adsorbed to the host-cell, if it is adapted: i.e., if biologically and biochemically, it is not too different from the cellular components. This adaptation is the result of passages, during which manipulation some 'marker' molecules of the original virus may survive and others will be attached to it by the host organism, by means of its own metabolism. When this grade of tolerance is not established, the virus particle becomes digested and assimilated, possibly during or shortly after its attachment and penetration. However, in case of an adapted strain, the intrusion of the viral nucleic acid into the cell will be accomplished[160], possibly in highly polymerized form.

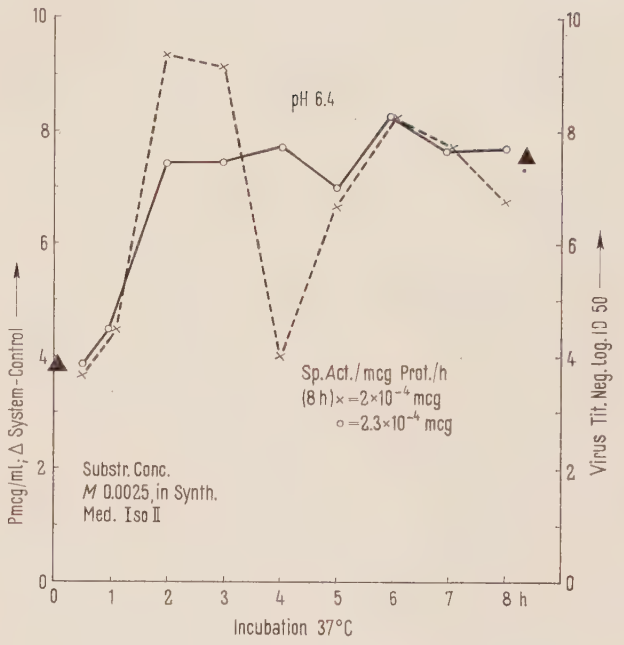

pH 6.4
Sp.Act./mcg Prot./h
(8 h) × = 2×10⁻⁴ mcg
○ = 2.3×10⁻⁴ mcg
Substr. Conc.
M 0.0025, in Synth.
Med. Iso II
Pmcg/ml; Δ System - Control
Virus Tit. Neg. Log. ID 50
Incubation 37°C
0 1 2 3 4 5 6 7 8 h

Fig. 1. Relative activity. Glucose-6-Phosphatase in HeLa culture.
×---× Infection 1 ml Type. I. Poliovirus, no dilution, 10 min adsorption.
○——○ Control + normal supernatant medium, 10 min adsorption.

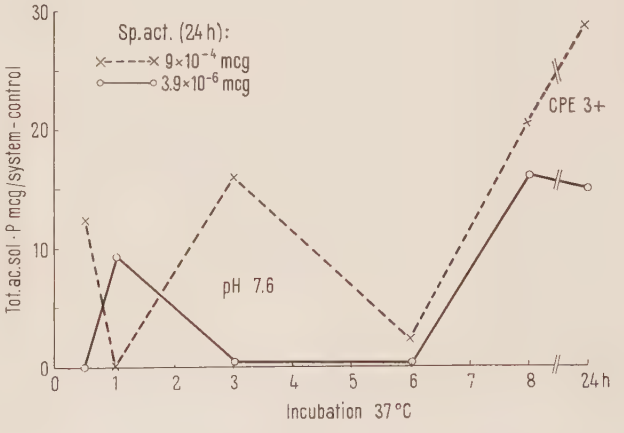


Fig. 2. Relative activity. RNase in HeLa culture.
× ---× Infection 2 ml Type. 1. poliovirus, 10° dilution, 5 min adsorption.
○——○ Control + normal supernatant medium, 10° dilution, 5 min adsorption.
Substrate 0·01% RNA in Medium Iso II + Hanks'.

[152] A. B. SABIN, W. A. HENNESSEN, and J. WINSSER, J. exp. Med. *99*, 551 (1954).
[153] E. W. HURST and R. HULL, Pharmacol. Rev. *8*, 199 (1956).
[154] M. CRISALLI, Igiene mod. *48*, 477 (1955).
[155] A. E. FARNHAM and A. A. NEWTON, Virology *7*, 449 (1959).
[156] A. LWOFF, Bacteriol. Rev. *23*, 109 (1959).
[157] M. LIKAR and D. C. WILSON, Brit. J. exp. Path. *39*, 674 (1958).
[158] T. F. MCNAIR SCOTT, J. Immunol. *81*, 98 (1958).
[159] S. CHÈVREMONT, H. FIRKET, M. CHÈVREMONT, and J. FREDERIC, Acta anat. *30*, 175 (1957).
[160] E. WECKER and W. SCHÄFER, Z. Naturf. *12b*, 483 (1957).

This is a decisive moment because in normal cells there should be no *free* nucleic acid present in similar macromolecular state and with some configurational differences[103]. Thus the appearance of virus nucleic acid, provokes an intense metabolic activity, for the mobilization or synthesis of new proteins to combine with and *neutralize* the invading nucleic acid (toward which they may possess great chemical affinity[161,162], in the form of a nucleoprotein. This combination with the close packing of the molecule protects the newly formed particle from hydrolases[163] and thus its survival is ensured. However, the synthesis of protein molecules requires new RNA molecules[123] and this need will be satisfied through the induction of nucleic acid synthesis, carried out at first partially, later exclusively, on the template of the infectious macromolecules. The model substance may be highly polymerized NA, or (in case of RNA-viruses) the 'core' indigestible by RNases consisting of di- and tri-nucleotides. This nucleic acid rest could be completed and rebuilt by adding mono- and oligo-nucleotides to it from the intracellular pool[92] of these substances. The small amount of surviving protein or peptides carried with the infective nucleic acid[65], may serve as a model for the protein-moiety of the virus. The other possibility might be that the physicochemical architecture of the nucleic acid determines the attachment of amino acids[124,125]; thus a *de novo* synthesis of protein is possible without a special template. This is however a theoretical possibility only at the present time. Any way, the play proceeds up and down until the synthesis of some of the consistituents becomes insufficient for a stochiometric combination. This mechanism may be one explanation for the appearance of incomplete or non-infectious particles, lacking, for instance, sufficient amounts of nucleic acid[162]. These forms are perhaps more vulnerable by the enzymic defense mechanism of the cell[164]. The specificity of the genetic material may survive only, if at least the 'core' is saved, serving as a frame in the reconstruction of RNA-molecule. For instance, when non-specific diesterases of the cells are absent or inhibited, the complete hydrolysis of the nucleic acid will be prevented[165,166] and the 'core' may be used as template of the resynthesis of the macromolecule. The experimental proof for these ideas of the writer is however still lacking[167], and they are mentioned mainly as a working hypothesis for the time being.

In conclusion we may underline again the extreme importance of the physiological state of the cell and its metabolism for the initiation and course of viral infections. However, a direct comparison between the various viruses and experimental systems is a condition forced upon us by the physical limitations of a short review. As a matter of fact, such comparison is permitted in certain cases only, and in exercising the greatest care and criticism. To draw an integrated picture, we have given preference to experimental data with certain viruses where our knowledge is more advanced. But this choice is made for the sake of convenience only and not for scientific reasons, or in an effort at premature generalization.

Zusammenfassung. Es werden die wichtigsten experimentellen Ergebnisse über Sauerstoffverbrauch, Zukker- und Fettumsatz, Funktion des Citronensäurecyclus und die Wirkung von Salzen und Milieufaktoren auf die Virusinfektion der tierischen Zelle referiert. Die Änderungen haben sehr verschiedene Bedeutung für die Physiologie der Zelle. Irreversible Schädigungen entstehen nur durch Änderung der Nukleinsäure- und Proteinsynthese, durch die virusbildende Einheiten entstehen.

Der zeitliche Ablauf der Prozesse wird am besten bei gezüchteten Zellen untersucht. Es zeigt sich deutlich die besondere Bedeutung der biochemischen Veränderungen, vor allem an den Enzymen, die den strukturellen Störungen vorausgehen. Der Autor weist darauf hin, dass die makromolekulare Schädigung, die das Wesentliche der Virusinfektion darstellt, chemisch interpretiert werden muss.

[161] F. C. McIntyre and M. F. Sproull, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *95*, 458 (1957).

[162] R. Markham, in P. Fildes and W. E. van Heyningen, *The Nature of Virus Multiplication* (The University Press, Cambridge 1953), p. 85.

[163] S. Gard and O. Maale, in F. M. Burnet and W. M. Stanley, *The Viruses*, Vol. I (Academic Press, Inc., New York 1959), p. 414.

[164] E. Kovács, Z. Vit. Horm. Ferm. Forsch. *10*, 348 (1960).

[165] J. S. Roth, Ann. N. Y. Acad. Sci. *81*, 611 (1959).

[166] R. J. Hillmoe, Ann. N. Y. Acad. Sci. *81*, 660 (1959).

[167] E. Kovács and H. Lennartz, Abstracts VII. Internat. Congr. Microbiol., Stockholm 1958 (Almqvist and Wiksell, Uppsala 1958), p. 241.

Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

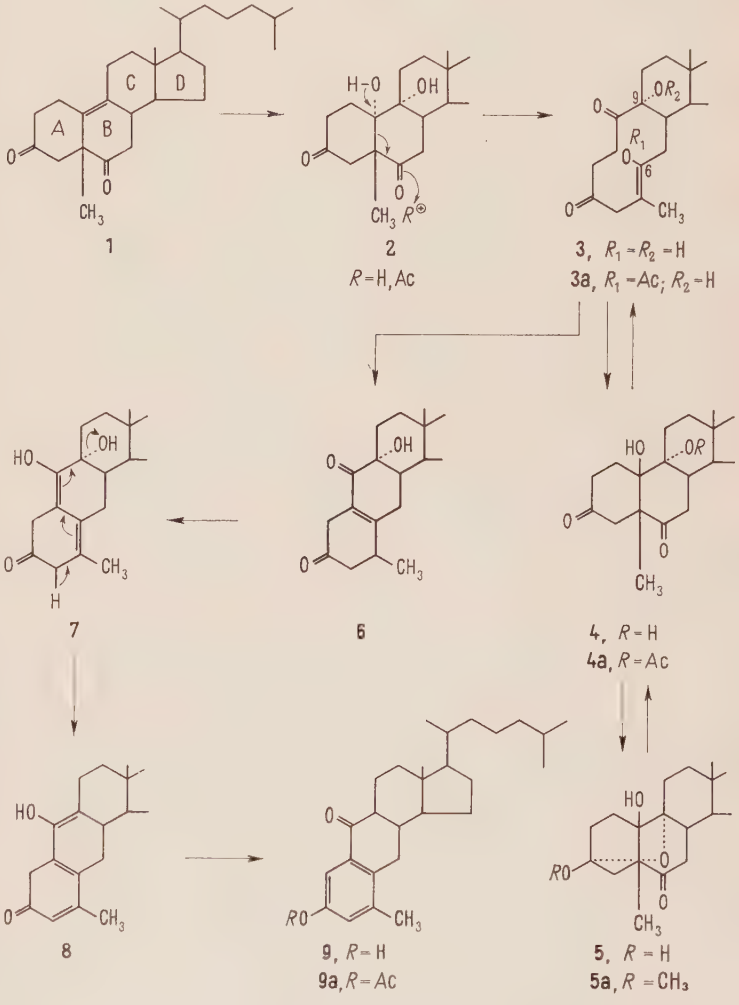
Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Retroaldol Transformations in the Westphalen Diol Series

Studies on the hydroxylation of the Westphalen diketone **1** have revealed a rearrangement sequence initiated by a retroaldolization process leading to what is in all probability the anthrasteroid **9**. Hydroxylation of **1**[1] with osmium tetroxide afforded the *cis* α-diol **2** (A/B *trans*), m.p. 172–174°, λ_{max}^{Chf} 2.9–3.0 μ (OH), 5.86 μ (C=O) (Found: C, 74.97; H, 10.47. Calc for $C_{27}H_{44}O_4$: C, 74.96; H, 10.25), which by its very nature is constrained in a B-ring boat conformation. The latter fact doubtlessly contributes to the ease of retroaldol isomerization of **2** in the presence of warm alkali to give the more stable isomer **4** (A/B *cis*) isolated as the transannular oxide tautomer **5**, m.p. 231–232°, λ_{max}^{Chf} 2.7, 2.85 μ (OH), 5.84 μ (C=O), 9.75 μ (C–O–C) (Found: C, 74.96; H, 10.41. Calc for $C_{27}H_{44}O_4$: C, 74.96; H, 10.25). On the other hand, acetylation of the *cis* α-diol **2** with acetic anhydride in hot pyridine appears to intercept **4** as its 9-acetate **4a**, m.p. 160–161°, λ_{max}^{Chf} 2.76 μ (OH), 5.84 μ (C=O), 5.73 and 7.95–8.0 μ (OAc) (Found: C, 73.25; H, 9.50. Calc for $C_{29}H_{46}O_5$: C, 73.30; H, 9.77). The formation of **4a** apparently occurs in virtue of transannular acyl transfer (C_6–O→C_9–O) in the dealdolized intermediate **3** probably present initially as its enol acetate (**3a**). This acetate derivative is different from the non-crystalline product derived from acetylation of **5**. Treatment of **4a** with hydrogen chloride in aqueous acetone at room temperature readily converts it to **5**; under these same conditions the *cis* α-diol, **2**, is unaffected. Characteristic of hemiketal groupings, the isomer **5** readily provides a methyl ether **5a** with methanolic hydrogen chloride, m.p. 127–128° (Found: 75.32; H, 10.16; CH_3O, 7.21. Calc for $C_{28}H_{46}O_4$: C, 75.28; H, 10.38; CH_3O, 6.95). This methyl ether exchanges two hydrogen atoms for deuterium (Found, 1.95) in alkaline deuterium butoxide solution thereby providing additional confirmation of structure **5a**.

Under more drastic alkaline conditions (hot 30% methanolic potassium hydroxide for 18 h) **5** undergoes further rearrangement, ostensibly by way of the same dealdolized intermediate **3** to give the phenolic ketone **9** (compare **5**→**9**), m.p. 206–207°, $\lambda_{max}^{CH_3OH}$ 258 mμ (ε = 8,140) and 324 mμ (ε = 2,760); λ_{max}^{Chf} 2.78 and 3.0 μ (OH), 5.98 μ (ar-conj. C=O), 6.18 μ (C=C) (Found: C, 81.82; H, 10.11. Calc for $C_{27}H_{40}O_3$: C, 81,75; H, 10.16); *Acetate derivative* **9a**; m.p. 133–134° (Found: C, 79,19; H, 9.54. Calc for $C_{29}H_{42}O_3$: C, 79.41; H, 9.65). The UV spectrum of the phenolic ketone **9** is essentially identical with that of 5-keto estrone. The N.M.R. spectrum of **9** confirms this structure as a phenol (τ = 3.45) having an aromatic methyl group (τ = 7.74) and bearing two *meta* disposed hydrogens (τ = 2.62 and 3.05)[2].

Zusammenfassung. Durch Behandlung mit Kalilauge überleidet 5β-methyl-19-norcholestan-9α,10α-diol-3,6-dione eine Retroaldolisomerisierung unter Bildung des 10β-Hydroxy-Isomers. Letzteres wurde als Hemiketalderivat isoliert. Bei drastischer Behandlung mit Alkali gehen beide Isomere in ein Anthrasteroid über.



H. L. Slates and N. L. Wendler

Merck Sharp and Dohme Research Laboratories, Rahway (New Jersey), January 9, 1961.

[1] First prepared by V. Petrow, O. Rosenheim, and W. W. Starling, J. chem. Soc. 671 (1938).

[2] The nuclear magnetic spectrum was carried out with a 60 megacycle Varian Model 4300-B spectrometer with benzene as external reference and deuteriochloroform as solvent. Resonances are reported as shielding value numbers (τ). The authors are indebted to Dr. N. R. Trenner and Mr. B. Arison for the determination and interpretation of this spectrum.

Papierchromatographie-Beitrag zur Bestimmung der C_3-Konfiguration bei Reserpoiden

Beim Studium von 105 Substanzen aus den verschiedensten Phasen der Reserpin- und Reserpoid-Synthese[1] erwiesen sich als geeignete Lösungsmittel für die Trennung und Charakterisierung dieser Substanzen am besten die Formamidsysteme. Da Endprodukte der Reserpoid-Synthesen schon von basischem Charakter vorliegen, verursacht Zugabe von Ammoniumformiat zu Formamid eine Abnahme der Rf-Werte sowie Fleckenabrundung. Diese Erscheinung konnte zu einer interessanten und eindeutigen Bestimmung ausgewertet werden, je nachdem es sich um ein Derivat handelte, dem die C_3-Konfiguration des Reserpins zuzuschreiben ist, oder ob es sich um ein Isoderivat handelte. Dies galt selbst dann, wenn nicht beide Isomere nebeneinander vorlagen und wir nicht über die entsprechenden Standardsubstanzen verfügten. Wurde das Alkaloid nebeneinander auf mit Formamid imprägniertem Papier und auf demselben Papier mit 5% Ammoniumformiat-Zusatz entwickelt, so enthält man bei der Verbindung der normalen Reihe auf dem Streifen mit Ammoniumformiat eine Abnahme des R_M-Wertes um 0,71–0,86 ($R_M = \log (1/Rf - 1)$)[2], während die Abnahme bei der Iso-Reihe lediglich 0,38–0,48 beträgt (Tab.)[3].

Im übrigen ist der direkte Unterschied zwischen den Derivaten der normalen Reihe und den Isoderivaten ziemlich beträchtlich: Auf mit Formamid imprägniertem Papier beträgt R_M ungefähr 0,80, auf Papier mit Ammoniumformiat sogar 1,15.

Summary. A method was devised for the estimation of the configuration on C_3 of reserpoides, based on the differences between Rf-values on paper impregnated with formamide and on paper impregnated with formamide containing ammonium formiate.

	Benzol-Cyclohexan 1:1		ΔR_M
	Formamid	Formamid mit Ammoniumformiat	
Reserpin	0,61	0,20	0,80
3-Isoreserpin	0,91	0,79	0,38
Deserpidin	0,75	0,34	0,77
3-Isodeserpidin	0,95	0,88	0,41
10-Fluordeserpidin	0,74	0,36	0,71
Methyl-O-(3,5-diäthoxy-4-methoxybenzoyl)-reserpat	0,88	0,57	0,74
Methyl-O-(m-methoxy-phenoxy-acetyl)-reserpat	0,50	0,12	0,86
10-Methyl-3-isodeserpidin	0,97	0,92	0,45
Methyl-O-acetyl-10-methoxy-3-isodeserpidat	0,69	0,42	0,48

K. MACEK

Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie, Prag (Tschechoslowakei), 3. August 1960.

[1] K. MACEK und S. VANĚČEK, Coll. Czech. Chem. Comm., im Druck.
[2] E. C. BATE-SMITH und R. G. WESTALL, Biochim. biophys. Acta *4*, 427 (1950). – I. M. HAIS und K. MACEK (Herausg.), *Handbuch der Papierchromatographie* (G. Fischer Verlag, Jena 1958), Bd. I, p. 64.
[3] Die in der Tabelle angeführten Substanzen wurden von den Arbeitsgruppen von Dr. PROTIVA und Dr. WEICHET in unserem Institut dargestellt.

Alkaloid Studies XXVI.[1] The Constitution of Pyrifolidine

In two recent papers from our laboratories[1,2] there has been recorded the isolation from Brazilian *Aspidosperma* species of five new alkaloids—refractine, pyrifoline, pyrifolidine, cylindrocarpine, and cylindrocarpidine—as well as the structure proof of the last two. In the present article, we propose a constitutional formula for pyrifolidine (I), based almost completely upon deductions from two physical tools, nuclear magnetic resonance and mass spectrometry, which have been introduced only very recently into indole alkaloid chemistry.

The elementary analyses[2] of pyrifolidine did not differentiate between $C_{22}H_{30}N_2O_3$ and $C_{23}H_{32}N_2O_3$, but the integrated NMR proton count (found: 32.0 ± 0.7) requires the presence of 32 hydrogen atoms, thus settling the empirical formula. The analytical and infrared spectral properties[2] of the alkaloid showed that the three oxygen atoms are present in one N-acetyl and two methoxyl functions. The NMR spectrum (Fig. 2) of pyrifolidine exhibits the typical aspidospermine (II) fingerprint (Fig. 1) in the region of $\delta = 2.90$–3.31[3], including the characteristic peaks ($\delta = 0.67$) of the C-ethyl group. Indeed, the only significant differences between the NMR spectra (Fig. 1 and 2) of aspidospermine (II) and pyrifolidine (I) lie in the aromatic and methoxyl regions, the latter alkaloid possessing *only two aromatic hydrogens* and both methoxyl groups ($\delta = 3.77$, 3.84) being aromatic. Since we had already indicated earlier[1] that such similarities in NMR spectra are of great diagnostic value, and as the large spin-coupling (J = 8.2 cps) of the benzenoid hydrogens requires that they be adjacent, the NMR evidence is compatible only with structures I, VI, or VII for pyrifolidine. Of these expressions I or VI appear to be more plausible, since all alkaloids of the aspidospermine (II) class which have been encountered so far in nature possess a 7-methoxy-N-acyldihydroindole moiety.

Furthermore, moving a methoxyl group to the top of the ring (C-1′) should change the NMR fingerprint appreciably, while adding a second methoxyl (at C-3′) would be expected to have little effect. On these grounds, we prefer structure I for the alkaloid. The ultraviolet absorption spectrum[2] of pyrifolidine (I) is somewhat shifted as compared to that[4] of aspidospermine (II), but

[1] Paper XXV, C. DJERASSI, A. A. P. G. ARCHER, T. GEORGE, B. GILBERT, J. N. SHOOLERY, and L. F. JOHNSON, Exper. *16*, 532 (1960).
[2] B. GILBERT, L. D. ANTONACCIO, A. A. P. G. ARCHER, and C. DJERASSI, Exper. *16*, 61 (1960).
[3] For definition of δ, see [1], as well as C. DJERASSI, T. NAKANO, A. N. JAMES, L. H. ZALKOW, E. J. EISENBRAUN, and J. N. SHOOLERY, J. org. Chem., in press.
[4] See J. R. CHALMERS, H. T. OPENSHAW, and G. F. SMITH, J. chem. Soc. *1957*, 115.

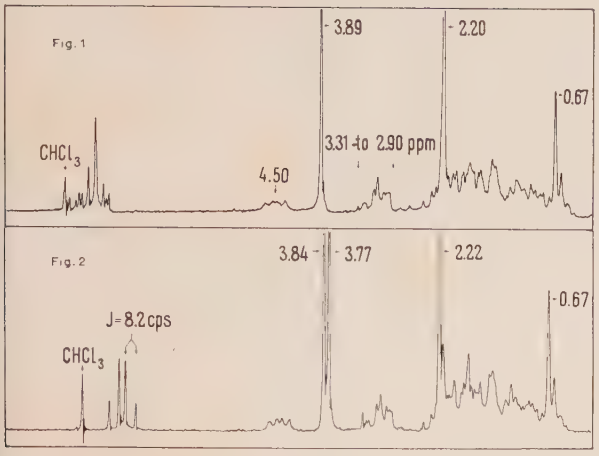
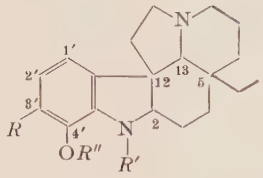
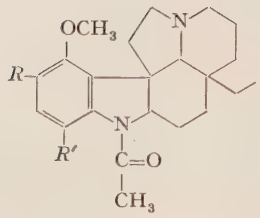


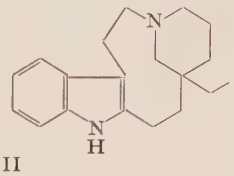
Fig. 1. NMR spectrum of aspidospermine (II). Fig. 2. NMR spectrum of pyrifolidine (I).



I: $R = OCH_3$; $R' = CH_3CO$; $R'' = CH_3$
II: $R = H$; $R' = CH_3CO$; $R'' = CH_3$
III: $R = OCH_3$; $R' = H$; $R'' = CH_3$
IV: $R = R' = H$; $R'' = CH_3$
V: $R = OCH_3$; $R' = CH_3CO$; $R'' = H$



VI: $R = H$; $R' = OCH_3$
VII: $R = OCH_3$; $R' = H$



VIII

we have been unable to find in the literature any suitable models with this chromophore in either the dihydroindole or hexahydrocarbazole series[4]. Indeed, this type of oxygenation pattern in the aromatic ring appears to be unique among the naturally occurring indole alkaloids.

This uniqueness and consequent difficulty in relating pyrifolidine (I) chemically to a known indole alkaloid prompted us to seek confirmation from another physical method, namely, mass spectrometry, which has been employed recently to resolve similar problems regarding the structures of sarpagine[5] and iboxygaine[6].

The mass spectra of deacetylpyrifolidine (III), (m.p. 147–149°, $[\alpha]_D + 7°$ ($CHCl_3$), λ_{max}^{EtOH} 215 and 293 mμ, log ε 4.40, 3.50; *Anal.* calc. for $C_{21}H_{30}N_2O_2$: C, 73.64; H, 8.83; N, 8.18; O, 9.34; methoxyl, 18.13; C-methyl, 4.39; found: C, 73.39; H, 9.08; N, 8.31; O, 9.36; methoxyl, 18.19; C-methyl, 3.49), and deacetylaspidospermine (IV) both exhibit a very strong peak at m/e 124 ($C_8H_{14}N$) and a group of smaller ones at m/e 138 and 152, all arising from the piperidine portion of the molecule. Another group of peaks (190, 203, 204, 314, and 341 in III, *vs.* 160, 173, 174, 284, and 311 in IV) is due to fragments still containing the indole nucleus, the difference in one methoxyl group accounting for the shift of 30 mass units. This difference is also expressed in the molecular ion peaks at m/e 342 and 312 (doubly charged species at m/e 171 and 156).

After completion of our work, there appeared a paper by McLean, Palmer, and Marion[7], in which they proposed structure V for the new *Aspidosperma* alkaloid aspidocarpine. Consequently, pyrifolidine (I) should be identical with O-methylaspidocarpine[7] and deacetylpyrifolidine (III) with deacetyl-O-methylaspidocarpine[7]. Indeed, the recorded (ref. [2,7] and the present paper) physical constants of these two pairs are in reasonable agreement, *except for the specific rotations which are opposite in sign.* Through the kind cooperation of Dr. L. Marion, it was possible to show that the infrared spectra (chloroform) of pyrifolidine (I) and O-methylaspidocarpine[7] were identical, and this also applied to the pair deacetylpyrifolidine (III) and deacetyl-O-methylaspidocarpine[7]; furthermore, the appropriate pairs exhibited identical mobility in chromatoplates on silica with the solvent system acetone-ethyl acetate (1:1). Most importantly, the optical rotatory dispersion curves of pyrifolidine and O-methylaspidocarpine[7] were of mirror-image type throughout the spectral range (700–300 mμ), thus establishing their enantiomeric relationship[8]. Since aspidocarpine has been related to aspidospermine (II), *pyrifolidine* (I) *must possess the antipodal absolute configuration at all four asymmetric centers* (C-2, -5, -12, and -13). We believe that this observation, coupled with the fact that both antipodes of the *Aspidosperma* alkaloid quebrachamine (VIII)[9] occur in nature[10], is of utmost significance in any biogenetic scheme[11] and we intend to comment on this point in our full paper.

Zusammenfassung. Die Struktur des *Aspidosperma*-Alkaloids Pyrifolidin (I) wird durch Protonresonanz und durch Vergleich mit Aspidospermin und Aspidocarpin bewiesen. Dieses Alkaloid ist in seiner absoluten Konfiguration ein Antipode des Aspidospermins.

C. Djerassi[12], B. Gilbert, J. N. Shoolery, L. F. Johnson, and K. Biemann

Department of Chemistry, Stanford University, Stanford (California), Instituto de Quimica Agricola, Rio de Janeiro (Brazil), Varian Associates, Palo Alto (California), and Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge (Massachusetts), December 5, 1960.

[5] K. Biemann, Tetrahedron Letters No. 15, 9 (1960).
[6] K. Biemann and M. Friedmann-Spitteler, Tetrahedron Letters, in press.
[7] S. McLean, K. Palmer, and L. Marion, Can. J. Chem. *38*, 1547 (1960).
[8] See C. Djerassi, *Optical Rotatory Dispersion* (McGraw-Hill Book Co., New York 1960).
[9] This biogenetically attractive structure has been suggested by G. F. Smith and J. T. Wrobel, J. chem. Soc. *1960*, 1463. – H. Kny and B. Witkop, J. org. Chem. *25*, 635 (1960).
[10] F. Walls, O. Collera, and A. Sandoval, Tetrahedron *2*, 173 (1958).
[11] See also, P. N. Edwards and G. F. Smith, Proc. chem. Soc. *1960*, 215.
[12] *Acknowledgement.* Financial support has been provided by grant H-5048 of the National Heart Institute, National Institutes of Health (U.S. Public Health Service), and by the Conselho Nacional de Pesquisas (Brazil). The postdoctorate research fellowship of B. Gilbert in Rio de Janeiro was financed from a grant of the Rockefeller Foundation in support of a collaborative research program between Stanford University and the Instituto de Quimica Agricola, Rio de Janeiro (Brazil).

Activation by Contact with Glass and the Action of Thrombin

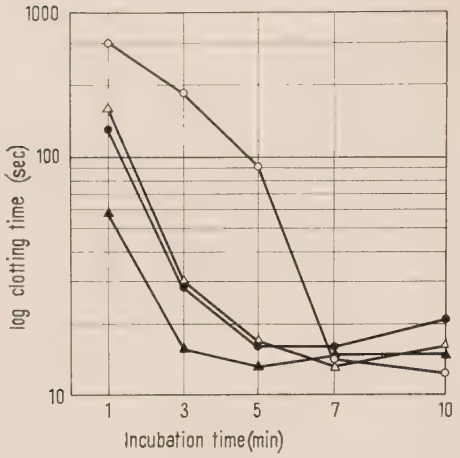


Fig. 1. Thromboplast inscreening test. ○——○ intact plasma + saline, ●——● intact plasma + 0.125 U. NIH thrombin, △——△ activated plasma + saline, ▲——▲ activated plasma + 0.125 U.NIH thrombin.

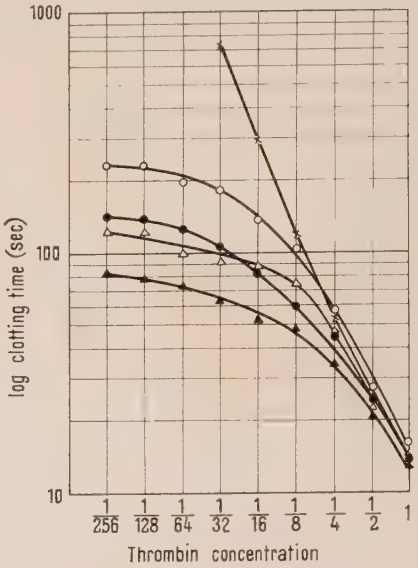


Fig. 2. Thrombin times of intact platelet poor plasma ○——○, activated platelet poor plasma ●——●, intact platelet rich plasma △——△, activated platelet rich plasma ▲——▲, and $BaSO_4$ adsorbed intact plasma ×——×.

In order to elucidate whether the catalytic action of thrombin on blood coagulation is dependent on contact activation by an activating surface, we investigated the effect of small thrombin concentrations on contact-activated and intact plasma.

Methods. All experiments with blood and plasma were carried out in siliconized test tubes and with siliconized pipettes. Siliconized needles were used for blood collecting.

Blood was collected from the cubital vein into a sodium oxalate solution (1 part of sodium oxalate $M/10$ to 1 part of blood). Immediately after collection, the blood was centrifuged at 3000 rpm. for 1 h (platelet poor plasma) or at 1500 rpm. for 10 min (platelet rich plasma). The plasma was then divided into two portions. One remained intact, the other was activated with a fine glass powder (100 mg to 1 ml plasma) and shaken by hand for 10 min at room temperature. The glass powder was removed by centrifugation at 1500 rpm. for 5 min. The activated and intact plasma were stored on ice during the whole of the experiment.

The chloroform extract from brain was prepared by the method of BELL and ALTON[1].

Thrombin (Behring) was diluted with saline.

A veronal-acetate buffer pH 7.35 and 0.025 M calcium chloride were used for the experiments.

The principle of the thromboplastin screening test[2] and the thrombin time were used for analysis.

All experiments were performed at 37°C in a water bath.

Results. The pattern of the thromboplastin screening test with normal activated and intact plasma is shown in Figure 1. The addition of 0.125 U. NIH thrombin has a marked accelerating effect, so that if thrombin in the concentration mentioned is added to the reaction mixture containing intact plasma, the development of the coagulation activity (thromboplastin + thrombin) is practically the same as in activated plasma to which no thrombin was added. Thrombin, however, has a greater effect on activated plasma.

We then investigated the coagulation times of intact and activated plasma after addition of thrombin in the one-stage arrangement (thrombin time).

The correlation between thrombin concentration and thrombin times obtained with intact, platelet-poor and -rich plasma and activated platelet-poor and -rich plasma is demonstrated in Figure 2. The longest coagulation times were obtained with intact platelet-poor plasma.

The thrombin times of $BaSO_4$ adsorbed plasma are the same before and after activation (Fig. 3). The total shape of the curve of the thrombin dilution with adsorbed plasma differs essentially from that with non-adsorbed plasma. In haemophilic A and B plasma (Fig. 4), the difference in thrombin times before and after activation is far less pronounced than in normal plasma.

On studying the thrombin times, we found that if no calcium chloride was added to the coagulation mixture, the slope of the dilution curves was always very steep.

Discussion. It can be seen from these experiments that previous contact activation of plasma is not essential for the accelerating action of thrombin in the blood coagulation process. In the concentrations used, thrombin apparently acts mainly through the intrinsic clotting system (blood thromboplastin formation) and not by direct action on fibrinogen. The exact mechanism of the accelerating effect of thrombin is not yet known.

Thrombin formed by the action of tissue thromboplastin released from damaged tissue and plasma factors on prothrombin may speed up the formation of blood thromboplastin and thus initiate the whole coagulation process. The thromboplastin accelerating effect of small thrombin concentrations may well be the important link in the hemostatic process responsible for the fact that persons deficient in the Hageman factor do not bleed[3].

Zusammenfassung. Thrombin in kleinen Konzentrationen beschleunigt den Verlauf des Thromboplastin-Differenzierungs (screening)-Tests, unabhängig davon, ob

[1] W. N. BELL and H. G. ALTON, Nature (Lond.) *174* (1954).
[2] N. D. HICKS and W. R. PITNEY, Brit. J. Haemat. *3*, 227 (1957).
[3] O. D. RATNOFF and J. E. COLOPY, J. clin. Invest. *34*, 62 (1955).

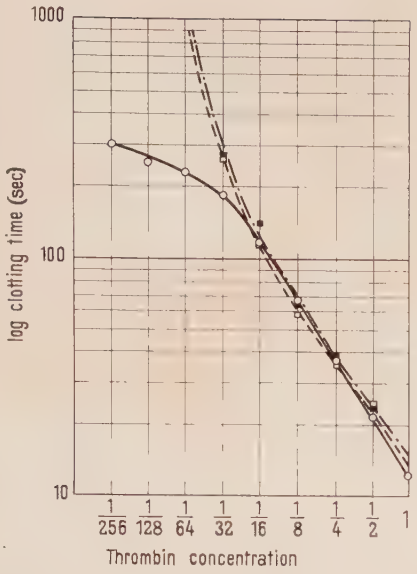


Fig. 3. Thrombin times of $BaSO_4$ adsorbed plasma before □——□ and after ■——■ contact activation. Thrombin time of normal intact plasma ○——○.

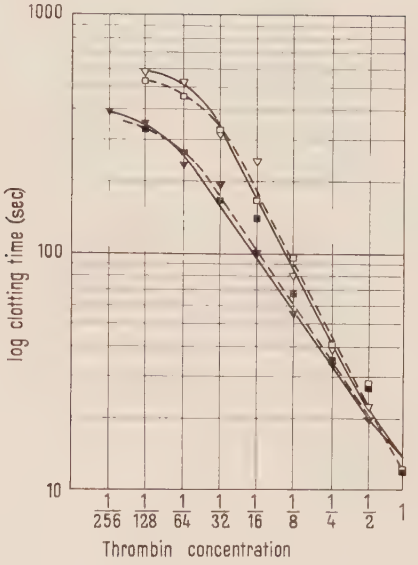


Fig. 4. Thrombin times of haemophilic A plasma before △——△ and after ▲——▲ activation and haemophilic B plasma before □----□ and after ■----■ activation.

das Plasma vorher durch Kontakt aktiviert wurde oder nicht. Die Wirkung des Thrombins zeigt sich jedoch deutlicher bei aktiviertem Plasma. Die Thrombinzeit des aktivierten Plasmas ist kürzer als die von inaktivem Plasma.

P. Pudlák, Irena Stará, and Erika Deimlová

Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague (Czechoslovakia), October 24, 1960.

Versuche zur Isolierung der γ-Globuline aus Kaninchenserum durch Acetonfällung[1]

Proteine lassen sich bekanntlich durch Aceton reversibel fällen. Von dieser Möglichkeit zur Gewinnung gereinigter Proteine ist bisher unter anderem Gebrauch gemacht worden bei der Isolierung von Fermenten (Colowick und Kaplan[2]) und bei der Einengung von Liquor (Bücher, Matzelt und Pette[3]). Die Anwendung organischer Lösungsmittel zur Fällung von Proteinen beruht einmal auf einer Herabsetzung der Dielektrizitätskonstanten, zum anderen auf einer Verminderung des an das Protein gebundenen Hydratationswassers. Wie ein Vergleich von Dielektrizitätskonstanten zeigt, wird durch Zugabe von Aceton zu wässrigen Lösungen die Dielektrizitätskonstante einer solchen Lösung stark herabgesetzt (Wuhrmann und Wunderly[4]). Ausserdem ist Aceton mit Wasser in jedem Verhältnis mischbar und kann so den Proteinen das Hydratationswasser entziehen. Wegen der Bedeutung der γ-Globuline als Träger der Antikörpereigenschaften versuchten wir zunächst die γ-Globuline von den übrigen Serumproteinen zu trennen, zumal wir zeigen konnten, dass die Antikörpereigenschaften durch Acetonfällung nicht verloren gehen (Drees und Mester[5]). Über die erhaltenen Ergebnisse soll kurz berichtet werden.

Methodik. Für die Fällung wurde Kaninchen-Mischserum verwendet.

Die Chemikalien waren p.a. Substanzen der Firma Merck. Tris wurde von der Firma Sigma, USA, bezogen.

Für die Acetonfällung verdünnten wir 1 Teil Kaninchenserum mit 9 Teilen Tris-Puffer (pH 7,6; Ionenstärke 0,1) (Colowick und Kaplan[2]). Während der Fällung befand sich die Serumverdünnung in einem Eisbad und wurde magnetisch gerührt. Die Rührgeschwindigkeit war so schnell, dass noch keine Schaumbildung eintrat. Die Zugabe des vorgekühlten Acetons zu der Serumverdünnung erfolgte aus einer eisgekühlten Bürette. Die Zuflussgeschwindigkeit war so eingestellt, dass einerseits sich in der Serumverdünnung kein Schaum bildete, andererseits die Fällung nach 15 min beendet war. Die Fällung wurde dann auf einer Sole-gekühlten Zentrifuge (Pirouette, Phywe, Göttingen) 15 min bei 10000 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand von dem Sediment abgegossen und die Zentrifugenbecher mit der Öffnung nach unten auf Fliesspapier gestellt. Die dann noch am Rande der Zentrifugenbecher haftenden Flüssigkeitstropfen wurden mit Fliesspapier entfernt. Das in den Zentrifugenbechern verbleibende Sediment wurde mit dem halben Volumen des eingesetzten Serums mit phosphatgepufferter isotonischer Kochsalzlösung (pH 7,4) im Kühlraum geschüttelt, bis sich das Sediment gelöst hat. Befindet sich noch Albumin in der ausgefällten Fraktion, so ist die Lösung durchsichtig. Die Fraktion, die hingegen die von den übrigen Proteinen befreiten γ-Globuline ent-

[1] Ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.
[2] S. P. Colowick und N. O. Kaplan, *Methods in Enzymology*, vol. I, p. 282 und 143.
[3] Th. Bücher, D. Matzelt und D. Pette, Klin. Wschr. *30*, 325 (1952).
[4] F. Wuhrmann und Ch. Wunderly, *Die Bluteiweisskörper des Menschen* (Basel 1957), p. 100.
[5] O. Drees und Th. Mester, in Vorbereitung.

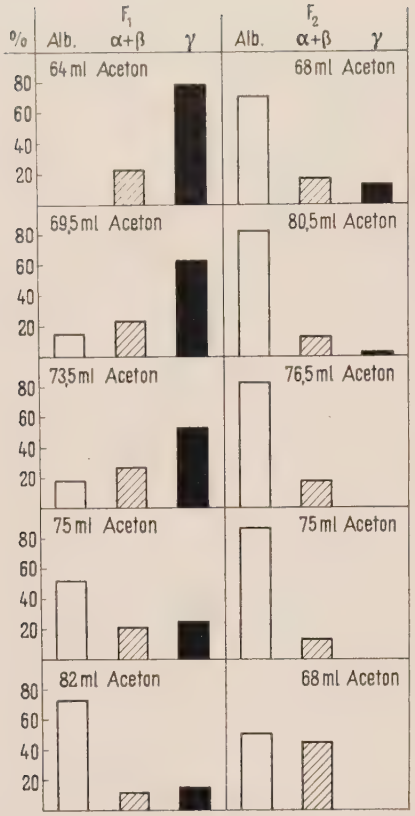


Fig. 1. Elektrophoretische Zusammensetzung (rel. Konz.) der Fraktionen F_1 und F_2 aus Kaninchen-Serum.

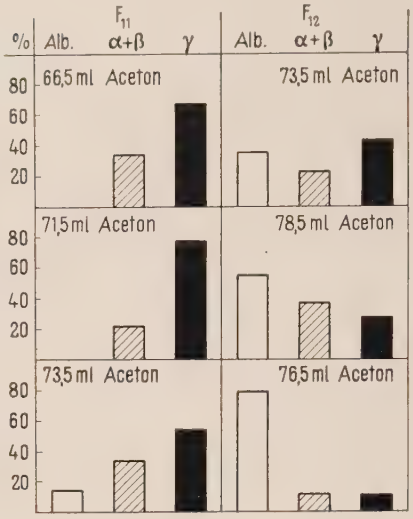


Fig. 2. Elektrophoretische Zusammensetzung (rel. Konz.) der Fraktionen F_{11} und F_{12} aus Kaninchen-Serum.

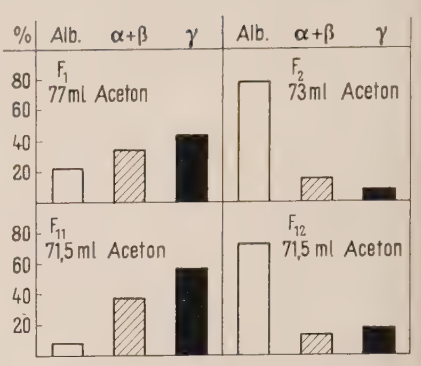


Fig. 3. Elektrophoretische Zusammensetzung (rel. Konz.) der Fraktionen F_1, F_2, F_{11} und F_{12} aus Affen-Serum.

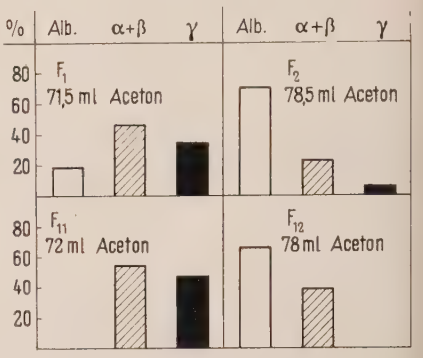


Fig. 4. Elektrophoretische Zusammensetzung (rel. Konz.) der Fraktionen F_1, F_2, F_{11} und F_{12} aus Meerschweinchen-Serum.

hält, zeigt eine mehr oder weniger starke weissliche Opaleszenz.

Während dieser Arbeitsgänge ist streng darauf zu achten, dass keine Erwärmung über + 2 bis + 3°C eintritt, da es sonst zu einer teilweise irreversiblen Denaturierung der Proteine kommt. Eine solche Denaturierung macht sich später während der Elektrophorese dadurch bemerkbar, dass Protein teilweise an der Auftragstelle liegen bleibt.

Die durch Acetonfällung erhaltenen Fraktionen wurden dann in der Papierelektrophorese (Protophor, Dargatz, Hamburg) auf ihre Zusammensetzung untersucht. Für die Elektrophorese wurde Veronal-Puffer (Na-Veronal, Na-Acetat; pH 8,6; Ionenstärke 0,1) benutzt (WUNDERLY[6]) und Whatman-Papier Nr. 1. Die Laufzeit betrug 16 h und der Spannungsabfall 75 V. Das Trocknen, Färben (Amidoschwarz 10 B) und Differenzieren der Pherogramme erfolgte ebenfalls nach WUNDERLY[6]. Die Pherogramme wurden nach TURBA und ENENKEL[7] ausgewertet (Photometer Eppendorf, 546 nm, 10 mm Küvette).

Ergebnisse. Die Isolierung der γ-Globuline erfolgte durch fraktionierte Acetonfällung. Es wurden 100 ml Serumverdünnung hergestellt (siehe Methodik!) und aus dieser durch Zugabe von 73,5 ml Aceton eine Fraktion F_1 erhalten. Nach dem Abzentrifugieren dieser Fällung wurde aus dem Überstand durch Zugabe von weiterem Aceton die Fraktion F_2 ausgefällt. Die Fällung von F_2 erfolgte durch Zugabe von so viel Aceton, dass 150 ml Aceton/100 ml Serumverdünnung erreicht wurden, in diesem Falle also 76,5 ml Aceton. Durch Variierung der für die Fällung der Fraktion F_1 notwendigen Acetonmenge wurde die Acetonmenge ermittelt, bei der alle γ-Globuline, aber möglichst wenig Albumin sowie α- und β-Globuline ausfielen.

Wie die Figur 1 zeigt, wurde durch Fällung mit 73,5 ml Aceton eine Fraktion F_1 erhalten, die alle γ-Globuline, aber nur wenig Albumin bzw. α- und β-Globuline enthielt. Die aus dem Überstand anfallende Fraktion F_2 enthielt den grössten Teil Albumin sowie α- und β-Globuline. Wurde jedoch die Fraktion F_1 mit mehr Aceton (75 oder 82 ml) durchgeführt, so gelangten dadurch auch mehr Albumin sowie α- und β-Globuline in die Fraktion F_1. Wenn dagegen die Fraktion F_1 mit weniger Aceton (69,5 oder 64 ml) ausgefällt wurde, gelangten nicht alle γ-Globuline in die Fraktion F_1, sondern ein Teil fiel erst in der Fraktion F_2 aus.

Um aus der Fraktion F_1 möglichst auch noch den Rest Albumin sowie α- und β-Globuline zu entfernen, wurde die Fraktion F_1 nochmals in Tris-Puffer gelöst und einer zweiten Fraktionierung unterworfen.

Die Ergebnisse dieser zweiten Fraktionierung zeigt die Figur 2. Bei der Ermittlung der optimalen Bedingungen für die zweite Fraktionierung gingen wir genau so vor wie bei der Gewinnung der Fraktionen F_1 und F_2.

Aus der Fraktion F_1 erhielten wir durch Fällung mit 71,5 ml Aceton eine Fraktion F_{11}, die den grössten Teil der γ-Globuline, aber nur noch wenig α- und β-Globuline enthielt. Albumin konnte mit unseren Methoden nicht nachgewiesen werden. Die aus dem Überstand durch Fällung mit 78,5 ml Aceton erhaltene Fraktion F_{12} enthielt das Albumin, Teile der α- und β-Globuline und noch etwas γ-Globulin. Wurde F_{11} mit weniger Aceton gefällt, dann erhöhte sich der Anteil des γ-Globulins in der Fraktion

[6] CH. WUNDERLY, *Die Papierelektrophorese* (Aarau 1954), p. 36.
[7] F. TURBA und H. J. ENENKEL, Naturwissenschaften *37*, 93 (1950).

F_{12}. Bei Fällung von F_{11} mit mehr Aceton (73,5 ml) verringerte sich wohl das γ-Globulin in der Fraktion F_{12}, dafür fand sich aber Albumin in der Fraktion F_{11}, und auch der Anteil der α- und β-Globuline war erhöht.

In den Figuren 3 und 4 sind die durch fraktionierte Acetonfällung erhaltenen Fraktionen F_1, F_2, F_{11} und F_{12} aus Affen(*Macacus rhesus*)- und Meerschweinchenserum dargestellt. Nur durch Änderung der für die Fällung der Fraktionen F_1 und F_{11} notwendigen Acetonmenge gelang es in diesen beiden Fällen nicht, eine weitgehend gereinigte γ-Globulinfraktion zu erhalten.

Unter konstanten Bedingungen (pH, Ionenstärke und Ionenmilieu) gelang es, aus Kaninchenserum, hingegen nicht aus Affen- und Meerschweinchenserum, ein weitgehend gereinigtes γ-Globulin zu erhalten. Eine weitere Reinigung der γ-Globuline durch Änderung von pH, Ionenstärke und Ionenmilieu ist in Vorbereitung.

Summary. It is possible – under constant conditions, such as pH, ionic strength and ionic milieu – to purify γ-globulins from rabbit-serum, using the fractionated acetone precipitation.

TH. MESTER[8]

Stiftung zur Erforschung der spinalen Kinderlähmung und der Multiplen Sklerose, Hamburg-Eppendorf, 16. Dezember 1960.

[8] Mit technischer Assistenz von Fräulein CHRISTEL BORNA.

Pinguinain: Comparison of Cuban, Puerto Rican and the Thermal Properties

Introduction. The existence of two varieties of Bromelia pinguin fruit was observed by ASENJO and FERNANDEZ[1]. A long, thin fruit that gives a poor yield of juice is found in sandy soils near the seashore, and a smaller, round, thick fruit that yields large quantities of juice, grows in the interior at higher elevations. These variety differences have been noted in our laboratories in shipments received from Cuba and Puerto Rico. The fruit received from Cuba was long and thin and that from Puerto Rico was of the round, thick variety. ASENJO and FERNANDEZ[1] chose the latter fruit for their work; whereas, we performed our previous studies[2,3] as well as the present thermal studies on the Cuban variety.

In order to determine whether the proteins responsible for the enzymatic activity of these fruits were similar, electrophoretic study with the subsequent construction of electrophoretic titration curves for the components was employed.

Experimental. Electrophoretic Comparison: Samples of crude preparations[3] as well as purified fractions[3] from both the Cuban and Puerto Rican varieties were subjected to analytical electrophoresis in a Perkin-Elmer Model 38 A apparatus. A variety of ionic strengths from 0.05 to 0.15 and of pH conditions from 3.5 to 6.6 were used with various preparations to determine the number of components and the mobilities of these components in both the Cuban and the Puerto Rican fruit.

Buffers of 0.1 ionic strength were used in the determination of mobilities for the electrophoretic titration curves. The buffers employed below pH 4.0 were glycine HCl–NaCl. From pH 4.5 through 5.35 the buffers were acetate. Between pH 5.5 and 5.85, both acetate and phosphate NaCl buffers were utilized while above pH 5.85 only phosphate NaCl buffers were used.

Thermal Studies: The proteolytic activities of the crude Cuban pinguinain were determined by a modification[3] of the BIDWELL[4] and OAKLEY[5] azocoll procedure.

To determine the thermal inactivation of pinguinain, 1 ml aliquots of enzyme in acetate, pH 5.2, buffer were incubated in a water bath at the given temperatures for 10 min. The solutions were immediately diluted to 10 ml with ice cold acetate buffer containing enough cysteine to give a final concentration of 0.05 *M*. The protease activity was then determined at 37°C.

The effect of temperature upon the reaction rate was determined in acetate buffer, pH 5.2, containing 0.05 *M* cysteine. In this study the enzyme was incubated for 20 min in the presence of the substrate at the given temperatures.

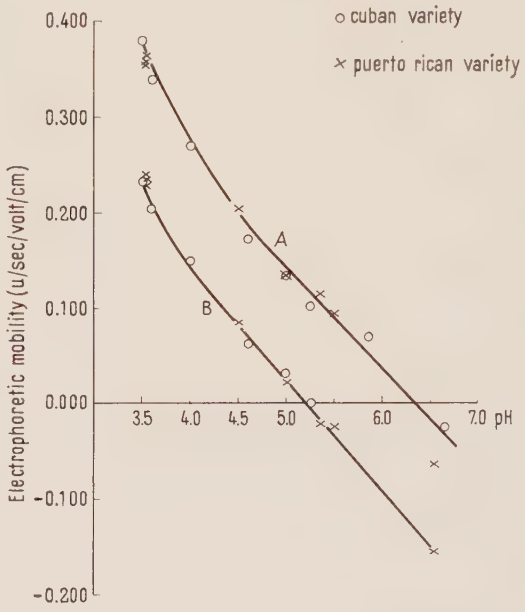


Fig. 1. Electrophoretic titration curve for pinguinain A and B in 0.1 ionic strength buffers

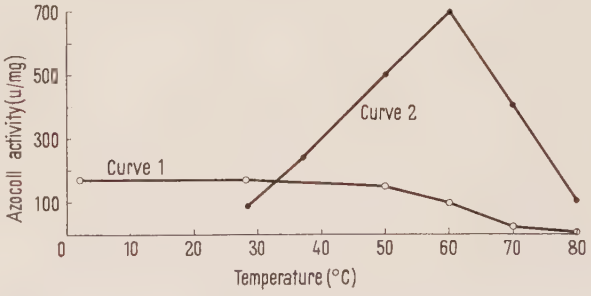


Fig. 2. Effect of temperature on the reaction rate and thermal inactivation of pinguinain solutions

[1] C. F. ASENJO, M. DEL C. FERNANDEZ, J. Agr. Univ. Puerto Rico *29*, 35 (1945).
[2] R. A. MESSING, Enzymologia *22*, 117 (1960).
[3] R. A. MESSING, A. F. SANTORO, and A. BLOCH, Enzymologia *22*, 110 (1960).
[4] E. BIDWELL, Biochem. J. *46*, 589 (1950).
[5] C. L. OAKLEY, G. H. WARRACK, and W. E. VON HEYNINGER, J. Path. Bact. *58*, 229 (1946).

Results and Discussion. Electrophoretic Comparison: Under all conditions of ionic strength and of pH, no more than two mobile electrophoretic components were observed with both the Cuban and Puerto Rican preparations. When the analyses were performed under similar conditions of pH and of ionic strengths, preparations from both varieties of fruit exhibited the same number of components and their mobilities fell within experimental error on each other.

The 0.1 ionic strength electrophoretic titration curves (Fig. 1) for the Puerto Rican pinguinain components are superimposable upon those of the Cuban proteins. For both varieties the isoelectric point for pinguinain A is approximately pH 5.2, and for the B-component the isoelectric pH is 6.4. Since the two protein components of these fruits behave identically when analyzed electrophoretically, the probability is great that they are the same proteins and that they perform the same enzymic functions.

Thermal Studies: Figure 2, curve 1 shows the effect of heat upon the activity of enzyme solutions exposed to various temperatures for 10 min in the absence of the substrate. Above 50°C activity decreased rapidly with almost complete inactivation occurring at 80°C.

The effect of incubation temperatures upon reaction rate is recorded in curve 2 of Figure 2. For each 10°C rise in temperature up to 60°C, activity increased approximately 200 μ/mg, while above 60°C activity decreased approximately 300 μ/mg. The 20 min temperature coefficients, Q_{10}, for the crude pinguinain-azocoll reaction are as follows: $Q_{10}(30°–40°C) = 2.40$; $Q_{10}(40°–50°C) = 1.66$; $Q_{10}(50°–60C°) = 1.40$.

Zusammenfassung. 1. Pinguinain-Präparate aus zwei verschiedenen Bromelia-Pinguinen enthielten dieselbe Anzahl elektrophoretischer Eiweisskomponenten von ähnlicher Laufgeschwindigkeit bei verschiedenen Ionenstärken und pH-Puffer-Bedingungen. 2. Pinguinain-Lösungen, die bei Temperaturen über 50°C gehalten wurden, zeigten starken Aktivitätsabfall. 3. Das 20-min-Temperatur-Optimum für die Roh-Pinguinain-Azokollreaktion wurde bei ca. 60°C gefunden. Es werden Q_{10}-Werte für die Roh-Pinguinain-Azokollreaktion angegeben.

R. A. MESSING

Biochemistry Department, Research Division, Ethicon Inc., Somerville (N. J.), November 14, 1960.

Endomeiosis in Parthenogenetic Lines of Aphids

It is generally admitted that the parthenogenetic egg of Aphids undergoes a single maturation division and a single diploid polar body is formed. It is believed therefore that chromosomes divide as in a normal mitosis and the eggs consequently develop with a diploid chromosome set that has not undergone pairing[1–3]. For this reason parthenogenesis in Aphids has been classified in the ameiotic type[4,5], although a transient pairing of chromosomes has been observed in three species of Aphids by VON BAEHR[6] and PASPALEFF[7]. No genetic variability should therefore be present in single parthenogenetic lines of Aphids.

Parthenogenetic strains of *Myzodes persicae*, which were originated from a single female, were employed for selection experiments, and the number of winged forms was reduced until they disappeared altogether in the course of nine generations. Selection was carried on through elimination of winged individuals in environmental conditions that appeared to be clearly favourable to the appearance of winged individuals in the controls[8].

The demonstration of genetic variability showed therefore the necessity of a cytological reinvestigation of the maturation divisions of the parthenogenetic eggs in Aphids. Research was carried on in *Macrosiphum rosae*, *Myzodes persicae*, and *Brevicoryne brassicae* which resulted to present the diploid chromosome number of 10, 14, 16 respectively.

Thin chromatic filaments that show granules of varying thickness, which can be interpreted as chromomeres, can be observed in the nucleus of oocytes of very young embryos. Leptotene and zygotene stages could not be distinguished exactly (Fig. 1a). The filaments undergo successively a remarkable contraction and the parallel arrangement of the homologous chromosomes in the haploid number of bivalents becomes evident. The homologous granules of the filaments are also well distinguishable (Fig. 1b). This stage is interpreted as a pachytene stage.

Each bivalent contracts until it assumes a thick irregularly rhomboidal form which shows an empty space in the middle. The nucleolus is always present (Fig. 1c). This stage is considered as intermediate between diplotene and diakinesis stage.

Chromosomes of *M. rosae* and *B. brassicae* appear highly contracted into two pairs of strictly linked hemispheres when the oocyte begins the descent into the ovarian chamber (Fig. 1d; 2). The single bivalents then divide and the univalents remain within the nucleus because no achromatic spindle is formed and the nuclear membrane is not dissolved. The detachment is not synchronous in all the bivalents and the univalents can be observed when some chromosomes are still paired (Fig. 1e; 3). When all the bivalents have separated, 10 chromosomes can be counted in *M. rosae*, 16 in *B. brassicae* within the nuclear membrane.

Chromosomes of *M. persicae* do not assume the appearence of paired hemisphere, although they continue to contract after diakinesis stage. The detachment of bivalents is also asynchronous and the univalents remain within the nucleus (Fig. 1d, e).

The nucleolus of *M. rosae* disappears before the oocyte has passed into the ovarian chamber. It is always present in other species.

After the bivalents have separated and the diploid number of chromosomes has been restored, the chromosomes concentrate in the centre of the nucleus in *M. rosae*, they remain scattered in *B. brassicae* and homologous chromosomes tend to approach each other in *M. persicae*.

Chromosomes then become less distinct and the nucleus shows filaments and scattered chromatin granules. In *M. persicae* chromosomes condense around the nucleolus. The oocyte increase considerably in size, big vacuoles are

[1] F. BLOCHMAN, Morph. Jahrb. *12*, 544 (1887).
[2] N. STEVENS, J. exp. Zool. *2*, 313 (1905).
[3] G. TANNREUTHER, Zool. Jahrb. *24*, 609 (1907).
[4] E. SUOMALAINEN, Adv. Gen. *3*, 193 (1950).
[5] W. WHITE, *Animal Cytology and Evolution* (1954).
[6] W. VON BAEHR, La Cellule *30*, 317 (1920).
[7] G. PASPALEFF, Jahrb. Univ. Sofia Phys. Math. Fak. *25*, 238 (1929).
[8] G. COGNETTI, Boll. Zool. Napoli *27*, 107 (1960).

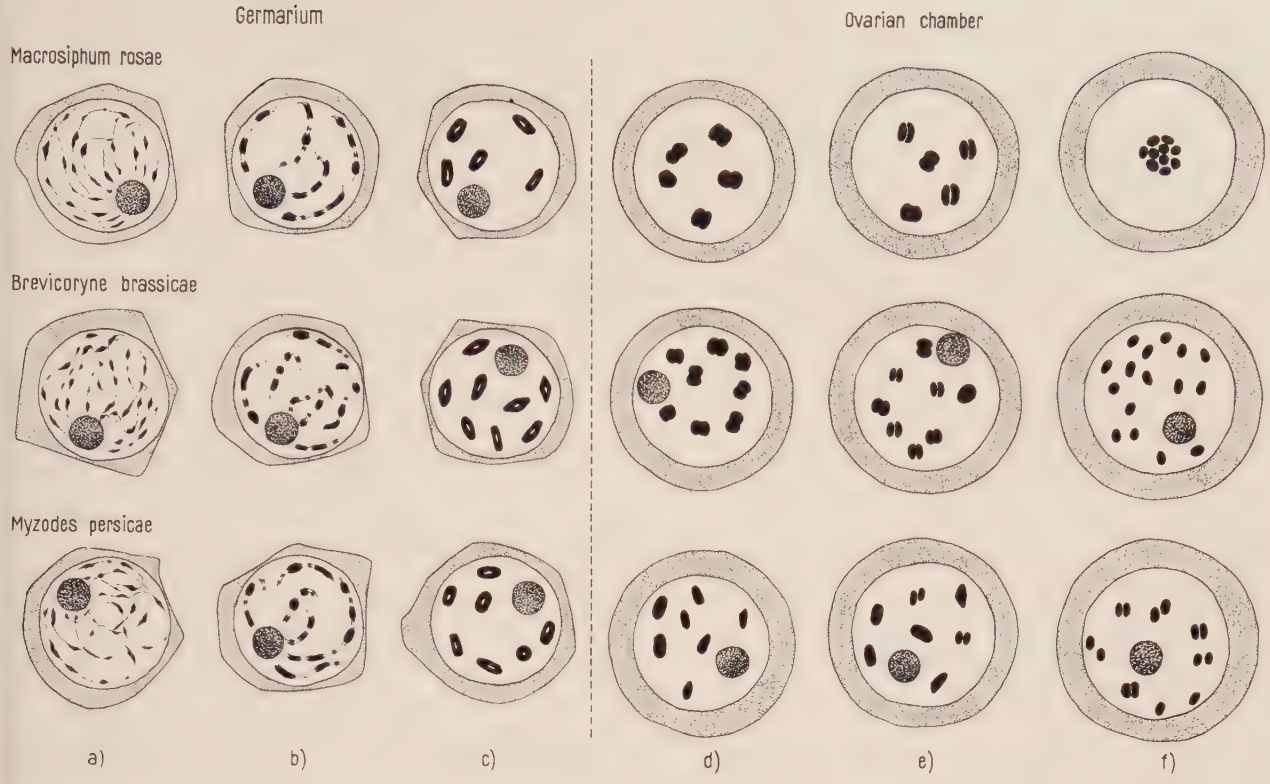


Fig. 1. Diagram of the early egg development.

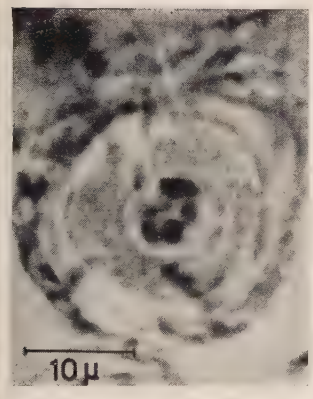


Fig. 2. First metaphase in parthenogenetic oocyte of *M. rosae* (Feulgen, light green).

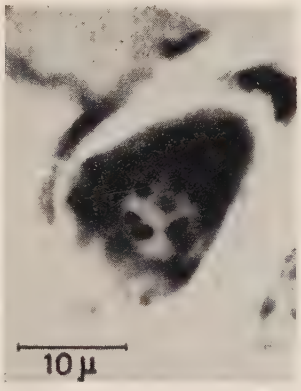


Fig. 3. Separation of the bivalents in parthenogenetic oocyte of *M. rosae* (iron hematoxilin).

formed in the cytoplasm and the nucleus shifts towards one side of the egg cell. Chromosomes in diploid number appear again and they are very elongated in the beginning. They contract again considerably and the nuclear membrane disappears. The polar kinesis corresponds to the description of previous authors[1–3].

The pairing of chromosomes which has been demonstrated above, enables us to explain the result of selection against winged individuals obtained in parthenogenetic lines of *M. persicae*. Examples of variability in parthenogenetic lines of *Macrosiphum solanifolii* and *M. rosae*, which could not be satisfactorily explained by former authors[9–11], can also be interpreted on the basis of genetic recombination.

For the above reasons, parthenogenesis in Aphids cannot be considered of ameiotic type, as was concluded on the basis of the observation that a single diploid polar body is formed. The maturation of the parthenogenetic egg is obtained, on the contrary, through a peculiar meiotic process that can be named endomeiosis.

Riassunto. Durante la maturazione dell'uovo partenogenetico di *Macrosiphum rosae*, *Brevicoryne brassicae* e *Myzodes persicae* si ha un appaiamento e successivamente una disgiunzione dei cromosomi senza la formazione del fuso. I cromosomi rimangono nel nucleo in numero diploide. Successivamente si dividono per formare l'unico globulo polare.

Questi reperti citologici permettono di spiegare la possibilità di selezionare le forme attere in linee partenogenetiche di *M. persicae* e la variabilità di alcuni caratteri morfologici riscontrata in ceppi partenogenetici di *Macrosiphum solanifolii* e di *M. rosae* e che non avevano avuto una convinciente spiegazione. La variabilità genetica appare essere realizzata mediante il «crossing over» durante l'appaiamento cromosomico.

Pertanto la partenogenesi negli Afidi non deve essere considerata di tipo ameiotico. La maturazione dell'uovo partenogenetico è ottenuta mediante un processo meiotico che può essere chiamato endomeiosi.

G. Cognetti

Istituto di Zoologia, Università di Modena (Italy), December 27, 1960.

[9] E. Patch, Maine agr. exp. St. Bull. *242*, 205 (1915).
[10] F. Shull, Amer. Nat. *59*, 289 (1925).
[11] L. Provasoli, Boll. Zool. Agr. Milano *11*, 1 (1940).

	[a]		[b]		[c]		Q_{10} [d]	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Bacillus mesentericus	118 ± 9	103 ± 15	154 ± 15	122 ± 3	107 ± 12	105 ± 12	2,60 ± 0,17	2,52 ± 0,18
Clostridium sporogenes	169 ± 21	105 ± 8	133 ± 13	120 ± 2	185 ± 16	100 ± 5	3,22 ± 0,08	2,76 ± 0,31
Proteus vulgaris	128 ± 19	106 ± 10	157 ± 7	125 ± 11	68 ± 14	86 ± 14	3,17 ± 0,23	2,49 ± 0,06
Achromobacter liquefaciens	129 ± 6	99 ± 11	129 ± 5	111 ± 9	144 ± 7	93 ± 8	1,87 ± 0,07	1,53 ± 0,05
Pseudomonas fluorescens	114 ± 5	92 ± 20	129 ± 11	117 ± 8	60 ± 21	127 ± 10	2,07 ± 0,24	1,68 ± 0,11

[a] Veränderungen der Peptidaseaktivität nach Einfrieren von Bakterienkulturen, 1 = erstmalig, 2 = wiederholt, in % bezogen auf die Aktivität vor dem Einfrieren, angeführt als Mittelwerte M ± s.

[b] *Idem* bei Kältewirkung auf Bakteriensuspensionen, 1 = Normalkulturen, 2 = kälteselektierte Kulturen.

[c] *Idem* bei Kältewirkung auf zellfreie Enzympräparate, 1 = aus Normalkulturen, 2 = aus kälteselektierten Kulturen.

[d] Q_{10}-Werte, 1 = Normalkulturen, 2 = bei kälteselektierten Kulturen/als M ± s.

Kälteeinfluss und Peptidase-Aktivität von Bakterien

Auf Grund von Messungen der Spaltung von D,L-Leucylglycin, Glycylglycin, D,L-Leucylglycylglycin und Triglycin wurde der Einfluss des Einfrierens auf die Peptidase-Aktivität intakter Bakteriensuspensionen sowie der aus ihnen gewonnenen zellfreien Enzympräparate untersucht. Dabei wurden Kulturen von *Bacillus mesentericus*, *Clostridium sporogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens* und *Achromobacter liquefaciens* verwendet, welche in ihrer Kälteresistenz und hinsichtlich der Wachstumstemperatur-Optima unterschieden sind. Sämtliche Bakterienarten waren zum Teil über ein Jahr auf einer Fleischoberfläche eingefroren (−18°C), zum Teil waren sie keinem Kälteeinfluss ausgesetzt. Der physiologische Zustand der Bakterien nach dem Auftauen wurde mittels Bestimmung des Nährstoffbedarfs bestimmt[1]. Die Wirkung kurzfristigen Einfrierens (24 h) auf Normalkulturen, auf Bakterienkulturen, die dem Kälteeinfluss bereits ausgesetzt waren, auf entsprechende Bakteriensuspensionen und auf zellfreie Enzyme unmittelbar vor deren Aktivitätsbestimmung wurde untersucht. Standardisierung der Bakteriensuspensionen und Präparation der Enzyme war die übliche. Die Pufferextraktion (bei pH 7,4) von zertrümmerten Zellen ist bereits ausführlich beschrieben[2]. Die Messung der Peptidspaltung wurde gleichzeitig titrimetrisch[3] mittels quantitativer Papierchromatographie über die Ninhydrinfarbstoff-Kupfer-Komplexe[4] und manometrisch über CO_2-Produktion am Warburgapparat verfolgt[5]. Die zur Auswertung der Versuche herangezogenen Messwerte wurden mit mindestens zwei der angeführten Methoden bestätigt. Es wurde darauf geachtet, dass die Streuung der Einzelbestimmungen, berechnet als Mass der Abweichung unter 5, die Differenz zwischen diesen Methoden unter der angeführten statistischen Grenze lagen. Die Inkubation der Enzym-Substratgemische erfolgte bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 7–40°C. Temperaturkoeffizient (Q_{10}) und Spaltungskinetik wurden als Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung berechnet.

Die Ergebnisse dokumentieren, dass bei unter Kälteeinfluss überlebenden Bakterien physiologische Veränderungen auftreten. Ein Teil der überlebenden erlitt Kälteschäden, die sich in erhöhtem Nährbedarf und entsprechend vermindertem enzymatischem Spaltungsvermögen äusserten. Hingegen zeigte jener Teil der Bakterien, der unter Kälteeinfluss die Fähigkeit zum Wachstum auf Minimalboden nicht verloren hatte, unter allen Versuchsbedingungen ein statisch gesichertes höheres Peptidspaltvermögen als die konformen Bakterien, welche keiner Kältewirkung ausgesetzt waren. Auch bei kurzfristigem Einfrieren ergab sich vergleichbare Wirkung. Dieser physiologische Unterschied verminderte sich im Laufe der monatlichen Überimpfungen unter normalen Kulturbedingungen. Wir nehmen an, dass es bei der Kälteeinwirkung zu einer Selektion resistenter Keime gekommen ist, welche gleichzeitig physiologisch kräftiger bzw. Peptidasen-aktiver sein müssen. An dieser Hypothese ändert meines Erachtens der Umstand nichts, dass unter normalen Kulturbedingungen der Effekt der Kälteselektion verloren ging.

Es konnte ferner festgestellt werden, dass die Q_{10}-Werte der Enzymwirkung im Bereich von 40–30°C bei Versuchen mit langfristig eingefrorenen Bakterienkulturen bis um die Hälfte niedriger lagen als bei parallelen Untersuchungen mit gleichartigen Kulturen ohne vorangehende Kälteeinwirkung. Ähnlich war auch der Unterschied zwischen den Q_{10}-Werten im Temperaturbereich von 40–30°C und jenen im Bereich von 30–20°C bzw. 17–7°C. Eine besonders ausgeprägte Verminderung im Abfall des Temperaturkoeffizienten konnte bei den psychrophilen Kulturen von *Pseudomonas* und *Achromobacter* beobachtet werden. Da sich dieser Effekt ausschliesslich nach langdauernder Kältewirkung auf Bakterienkulturen, nicht aber beim Gefrieren von zellfreiem Enzymmaterial einstellte, durfte angenommen werden, dass dem Wirkungsmechanismus ein temporärer biologischer Adaptionsprozess zugrunde liegt. Temporär deswegen, weil auch diese physiologische Besonderheit nach ungefähr einem halben Jahr für die Normalkulturen nicht mehr signifikant war.

Auch kurzfristiges Einfrieren von Bakteriensuspensionen und Enzympräparaten hatte Veränderungen des enzymatischen Spaltungsvermögens zur Folge. «Kälteselektierte Kulturen» verhielten sich auch in diesen Fällen unterschiedlich, indem die aus ihnen bereiteten Bakteriensuspensionen nach abermaliger Kälteeinwirkung zumeist nur eine unbeträchtliche Aktivitätserhöhung zeigten, wogegen die Enzymwirkung der Bakteriensuspensionen aus «Normalkulturen» durch das 24stündige Einfrieren durchwegs zu ausgeprägter Intensivierung führte. Wir bringen dieses Verhalten mit einer durch Kältewirkung erhöhten Permeabilität in Verbindung, die einen verstärkten Kon-

[1] J. ARPAI, Jahresbericht der Forschungsanstalt f. Gefriertechnik (Bratislava 1959).
[2] J. ARPAI, J. Bacteriol. *78*, 153 (1959).
[3] J. ARPAI, Chem. Zvesti *14*, 148 (1960).
[4,5] J. ARPAI, Chem. Zvesti, im Druck.

takt der intrazellulären Peptidasen mit dem Substrat ermöglicht. Schwer erklärbar sind verschiedenartige Veränderungen in der Aktivität der zellfreien Enzympräparate, die nach dem Einfrieren zum Teil unverändert blieb, meist aber verstärkt, oft aber auch abgeschwächt sein konnte. Wir vermuten, dass es in Abhängigkeit von Versuchsbedingungen und dem Zustand des Bakterienmaterials entweder zu kryolytischen Prozessen oder zur Kältedenaturation des kolloidalen Trägers gekommen ist. Im ersten Fall könnte eine erhöhte Besetzung der adsorbierenden Enzymoberfläche mit Substratmolekülen ermöglicht worden sein, was sich dann auf die Enzymkinetik positiv auswirken müsste. Im zweiten Fall wäre der Erfolg ein negativer.

Es wurden nur solche Ergebnisse besprochen, bei denen keine qualitativen Unterschiede bzw. spezifische Erscheinungen an einzelnen Substraten auftraten. Es bleibt noch zu bemerken, dass im allgemeinen die Dipeptide intensiver gespalten wurden als die Tripeptide.

Unser Bericht will vor allem auf einige der komplexen Probleme hinweisen, denen wir bei unseren Studien über Kältewirkung auf Mikroorganismen und deren Enzyme begegnet sind[6]. Ausführlichere Angaben über Methodik und gemessene Werte fortgesetzter Versuche folgen an anderer Stelle[1–6].

Summary. The effect of freezing on the peptidase activities of some bacteria and their cell-free enzyme preparations has been studied. Significant differences were found in the activity of peptidase and in their temperature coefficient.

J. Arpai

Mikrobiologische Abteilung der Forschungsanstalt für Gefriertechnik, Bratislava (Tschechoslowakei), 16. September 1960.

[6] J. Arpai, Biologia *15*, 461 (1960).

Amino Acids in the Endosperms of *Palmea* in Amazon

In the Amazonas, there are numerous *Palmae* plants which belong to a great many species. But they have scarcely been taken up as objects of scientific study until now.

As the foundation for the plant physiological or biochemical research and the utilization of these rich resources in the Amazonas, the amino acid composition of the endosperms of eleven species of *Palmae* was determined by the method of paper chromatography.

Materials were selected from the common species of *Palmae* in the Amazonas, so as to contain as many genera as possible, and to compare them: they are *Acrocomia sclerocarpa* Mart. (Mucajá or Macaúba), *Ascrocaryum tucum* Mart. (Tucumã), *Cocos nucifera* L. (Côco), *Elaeis guineensis* L. (Dendê), *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí), *Guilielma speciosa* Mart. (Pupunha), *Jessenia bataua* Burret. (Patauá), *Mauritia flexuosa* L. *f.* (Miriti or Muriti or Buriti), *Oenocarpus bacaba* Mart. (Bacaba), *Orbiginia martiana* Barb. (Babaçú) and *Scheelea martiana* Burret. (Urucuri or Jaú).

The acid hydrolyzates of the materials were chromatographed and the main acids were detected with ninhydrin reaction and identified on two-dimensional chromatogram developed with *n*-butanol-acetic acid-water (250:60:250)[1] and 80% phenol by the chromatographical comparison with authentic samples that are 0.01*M* solutions of amino acids in 10% isopropanol.

When one of the spots on the two-dimensional chromatogram corresponded to two or more authentic samples, a method of elution of spot was utilized and eluates were rechromatographed with other solvents.

These experiments were made under tropical conditions at 27–36°C.

26 substances were detected in all and seven of them could not be identified, i.e. spot 1 (Rf 0.20, 0.82), spot 2 (Rf 0.09, 0.21), spot 3 (0.90, 0.78), spot 4 (Rf 0.38, 0.97), spot 5 (Rf 0.43, 0.22), spot 6 (Rf 0.36, 0.12), and spot 7 (Rf 0.46, 0.00). The former Rf of every spot corresponds to *n*-butanol-acetic acid-water, the latter to 80% phenol on Whatman No. 1 filter paper.

Aspartic acid, glutamic acid, α-alanine, arginine, valine, leucine, isoleucine, serine, lysine, glycine, methionine, hydroxy proline and unknown spot 1 were found in the endosperms of all species of *Palmae* examined and the first four amino acids were contained in the largest quantity. Unknown spot 1 was detected as a trace in all species.

Proline and threonine were also found in all species examined except Patauá. Methionine sulfoxide, methionine sulfone, α-amino butyric acid, γ-amino butyric acid were detected as trace in about all of the species examined.

Cystine was also detected as a trace in Mucajá, Dendê, and Bacaba.

Unknown spot 2 was found in the most species except Côco, Pupunha, and Urucuri. The unknown substance 3 has a high Rf value and shows a yellowish round spot on a chromatogram developed with *n*-butanol-acetic acid-water. But, on two-dimensional chromatograms, it could not be detected and the eluates of spot 3 from one-dimensional chromatograms developed with *n*-butanol-acetic acid-water show long indistinct spots on chromatograms developed with 80% phenol. The substance was found in a considerable quantity in many species (Tucumã, Patauá, Buriti, Bacaba, and Babaçú). Unknown spot 4 was detected in Tucumã, and in Côco and Urucuri as a trace. Unknown spot 5 and 6 were detected as traces only in Babaçu and unknown spot 7 in Tucumã.

The details of this work will be published soon in Brazil.

Résumé. La composition amino-acide des Endospermes de 11 espèces de Palmacées de l'Amazone ont été étudiées en utilisant la méthode de la chromatographie sur papier. Des 26 substances découvertes 19 furent identifiées, 7 restèrent inconnues. L'étude détaillée paraîtra prochainement au Brésil.

Kimiyo Takeuchi[2]

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus (Amazonas, Brazil), November 15, 1960.

[1] A. J. Woiwood, in R. J. Block, E. L. Durrum, and G. Zweig, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis* (Academic Press, Inc., New York 1955), p. 78.

[2] The author wishes to express her gratitude to the Institute which gave her an opportunity to do this work in Amazona far from Tokyo (Biological Institute, The College of general Education, University of Tokyo).

The Oxygen Effect in Irradiated Mature and Meiotic Germ Cells of *Drosophila melanogaster*

Anoxia has been regarded as a radiation protector[1]. This finding started a series of investigations still in process which have revised the very nature of mutations. Previous workers[2,3] had noticed that irradiated water produces peroxides. It was argued that the cell, being a colloid in water, where the solutes are in small concentrations, should produce peroxides which cause mutations. Soon radiomimetic substances of this type were found[4].

By studying the different stages of spermatogenesis, from meiotic to mature sperm cells, and their mutability under different atmospheric conditions with X rays, we are able to: a) analyze the chromosome behaviour under these conditions as condensed and full with water in meiotic stages, and as uncondensed elements in the resting stage. At these two general periods of development, the chromosomes behaved differently with respect to the mutations induced by the irradiation. b) Furthermore, our data demonstrate the presence of an oxygen effect in meiotic stages only when lower doses are given. This differential response to oxygen is discussed in the light of a chromosome rejoining hypothesis.

Materials and methods. 0–10 h old *D. melanogaster* Oregon R males were irradiated with doses of 150, 300, 600, 1200, and 2400 r an intensity of 200 r/min and 12 mA with a Ghilardoni Therapy X-ray machine using a 4 mm Al. inherent filtration and a Siemens dosimeter. Three days old Basc females were used to facilitate the count of recessive lethals. The males irradiated were the laboratory stock of Oregon R. The F_1 females from the cross of Basc females and wild type males were bred singly with Basc males from the stock cultures, not with their own brothers because of the low fertility of males with irradiated chromosomes[5]. The absence of the wild type males in the F_2 indicated the presence of a lethal in the paternal X chromosome.

The mating scheme was daily crosses of the irradiated males to the virgin females for a period of 10 days. Thus, the males copulate daily to fresh 3 days old Basc females while the female is left another period of several days to lay eggs. The results of the first copulations represent the most mature and old samples of sperms, while the last samples represent the stages which were irradiated as meiotic stages. AUERBACH[6], on the other hand, changed her flies every 3 days in which one male copulated with 3 females, thus disregarding crowding effects upon the developing zygotes; with her method she reaches the stage of highest mutation rate in her second brood. With our method that stage is reached only after the 6th day and even the 9th day after irradiation. This fact points to a perfect or near perfect agreement between ours and AUERBACH's stage of highest mutation rate, as one of her males mating with 3 females releases the amount of sperm in one day that one of ours with a single female releases in 3 days. Since she kept her males mating for 3 consecutive days, in her first brood she reaches the equivalent of our 6th–9th days of mating depending upon a regular sperm ejaculation.

The gases given (O_2 and N_2) are passed directly to a bottle from the gas source. The bottle containing the males treated with the gas is then closed with a plastic cover top which maintains the gas in the bottle without loss during the irradiation time. The gases are given for 45 min before and after the X-ray treatment. The flies are in the same gas during the irradiation. During the pre and post treatment, the gas is allowed to flow through a cylindrical container, where the males remain, into an Erlenmeyer flask where it bubbles at a constant rate. No combination of gases was tried in the present work. The O_2 used was 99.6% pure, the rest were traces of water, N_2 was 99.9% pure and free of oils.

Results. Our results should be considered in the light of previous investigations which attempted to discover the sensitivity to X-rays in *Drosophila* spermatogenesis. The present preliminary report, as well as others here referred to, can get from mature spermatozoa down to the earlier stages of sperm development by using the sperm release successively in a series of copulations of the irradiated males. Thus, we may get to the stage of highest sensitivity (more mutability), amply demonstrated by others to correspond to the meiotic stage. With our daily mating scheme we are able to demonstrate, as shown in Tables I–III, that it is the late meiotic stage which is most sensitive to the different doses of X-rays. That is, the most sensitive period is the one immediately after the mature sperm supply is exhausted. The mature sperm are represented by the first sperm batches which are utilized, and which, according to the extend of the sperm ejaculations (which, by the way, are not uniform), are in store for the first 4–5 days of copulations in the mating conditions here established. The spectrum of mutation rate which we got can be divided in two clear zones: one formed by the most resistant spermatozoa and a second zone, immediately before the last one, formed by the most sensitive products of late meiosis.

Our second type of results consists in the different behaviour which spermatogenesis displayed in the presence of different gases. While oxygen increases the mutation rate, nitrogen serves as a protector from X-rays. The effect of oxygen on the two zones, genetically distinguished by their X-ray sensitivity, was the same. However, the results force us to make a distinction between the oxygen effect at lower doses (150 and 300 r) and its effects at higher doses (600, 1200, and 2400 r). While at lower doses there is no apparent oxygen effect for the stage of mature spermatozoa (the first 5 days of sperm release), although there is a clear oxygen effect in meiotic germ cells (50% + greater mutation rate in O_2 than in the corresponding stage in air or N_2), there is, at higher doses, an oxygen effect in both spermatozoa and meiotic stages.

Discussion. When we irradiate *D. melanogaster* germ cells which are undergoing spermatogenesis, we induce mutations at different stages of sperm development, the nature of which can be analyzed by the results we get from the mutability under certain conditions.

From our results we may discuss the following points concerning the incidence of mutations under certain conditions: a) the sensitivity spectrum observed during the first 10 days after irradiation; b) the effect of oxygen in the mutation frequencies.

The sensitivity spectrum corresponded, counting for the differences in the mating procedures, to the spectrum observed by AUERBACH[6] using crossing over and mutational data. Her peak of highest mutation rate was in the second brood. With a mating scheme of 1 male to 3 females, she quickly reached the sensitive stage because more copulations brought about a greater amount of sperm release than if 1 male is coupled with 1 female every

[1] J. M. THODAY and J. READ, Nature *160*, 608 (1947).
[2] O. RISSE, Strahlentherapie *34*, 578 (1929).
[3] H. FRICKE, Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. *2*, 241 (1934).
[4] O. WYSS, J. B. CLARK, F. HAAS, and W. S. STONE, J. Bacteriol. *56*, 51 (1948).
[5] H. J. MULLER, I. H. HERSKOWITZ, S. ABRAHAMSON, and I. I. OSTER, Genetics *39*, 741 (1954).
[6] C. AUERBACH, Z. Vererbungslehre *86*, 113 (1954).

Tab. I. Spectrum sensitivity of recessive lethals over a 10 day period of *Drosophila melanogaster* irradiated in air with 150, 300, 600, 1200, and 2400 r at 200 r/min

Dose		Days 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
150 r	X Chromosomes	249	124	252	236	248	270	346	243	337	302
	% Mutations	0.8	0.0	1.2	0.8	0.4	0.0	0.8	0.8	1.8	0.6
300 r	X Chromosomes	212	142	201	218	249	253	283	274	338	266
	% Mutations	1.4	0.0	0.9	1.4	1.2	2.4	2.1	1.4	2.9	1.9
600 r	X Chromosomes	100	126	244	216	253	218	205	222	200	222
	% Mutations	5.0	2.4	1.2	0.9	1.2	3.2	3.9	2.2	3.5	3.1
1200 r	X Chromosomes	219	205	239	216	217	236	246	369	314	276
	% Mutations	2.7	3.9	2.9	6.5	2.3	5.9	5.7	8.1	7.0	8.3
2400 r	X Chromosomes	155	232	276	263	239	142	150	209	124	152
	% Mutations	7.1	7.7	6.1	4.6	7.5	10.5	11.3	12.9	16.9	6.6

Tab. II. Spectrum sensitivity of recessive lethals over a 10 day period of *Drosophila melanogaster* irradiated in N_2 with 150, 300, 600 1200, and 2400 r at 200 r/min

Dose		Days 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
150 r	X Chromosomes	260	273	258	261	268	224	256	241	209	223
	% Mutations	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.44	0.4	0.4	0.9	0.4
300 r	X Chromosomes	175	137	181	171	179	188	193	171	226	152
	% Mutations	0.6	1.4	1.1	0.6	1.7	0.0	0.5	0.6	1.3	0.0
600 r	X Chromosomes	291	256	266	272	271	267	266	269	257	190
	% Mutations	1.0	1.2	0.7	1.8	1.1	1.5	2.6	2.6	2.3	1.1
1200 r	X Chromosomes	198	227	263	146	223	179	284	200	249	239
	% Mutations	1.5	1.7	2.6	2.1	2.2	2.2	2.1	4.5	3.2	2.1
2400 r	X Chromosomes	148	261	252	250	224	238	225	154	123	182
	% Mutations	2.7	4.6	5.5	6.8	6.7	4.2	4.8	3.9	12.2	5.5

Tab. III. Spectrum sensitivity of recessive lethals over a 10 day period of *Drosophila melanogaster* irradiated in O_2 with 150, 300, 600, 1200, and 2400 r at 200 r/min

Dose		Days 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
150 r	X Chromosomes	219	215	212	178	231	326	339	209	182	299
	% Mutations	0.0	0.5	1.0	1.0	0.4	2.7	1.7	1.9	4.4	1.3
300 r	X Chromosomes	56	203	214	211	168	135	241	216	142	196
	% Mutations	0.0	0.5	0.9	1.4	2.9	2.2	2.9	3.7	3.5	3.5
600 r	X Chromosomes	90	71	64	37	123	64	63	50	42	24
	% Mutations	1.1	4.2	1.5	8.1	1.6	3.1	3.1	2.0	4.7	0.0
1200 r	X Chromosomes	108	125	115	102	86	92	104	97	27	21
	% Mutations	6.5	5.6	6.9	5.9	5.8	7.6	9.6	4.1	3.7	19.4
2400 r	X Chromosomes	29	93	120	104	90	26	32	33	16	6
	% Mutations	3.4	12.9	10.0	11.6	10.0	0.0	9.4	18.2	6.2	0.0

day, as in our present mating system. With our procedure we reach the highest mutation rate on the 6–9th day. That peak is present in air, N_2 and O_2. Furthermore, we are able to notice that the sensitive zone is exhausted in 2–3 days. From AUERBACH[6], AUERBACH and MOSER[7], and KHISHIN[8] we learn that the meiotic product extends over several days of sperm release, as they used a male to three females for three days per brood, i.e. at least 6–7 days by our system of mating. Therefore, we are inclined to believe that our highest mutation period involved only late meiosis.

It is unnecessary to discuss the negligible influence which germinal selection may have in the sensitivity spectrum. For this purpose we refer the reader to PONTECORVO[9], who relegates the role played by germinal selection to immature spermatogonia.

The effect of oxygen augmenting the effectiveness of X-rays mutagenicity is well established[10]. However, the mechanism by which the oxygen effect takes place is still unknown. Some believe the effect of oxygen is on the primary breakage of the chromosomes at the time of irradiation. This hypothesis is well grounded in experiments by THODAY and READ[11]. Nevertheless, recent results[12–14] of oxygen metabolism acting on the rejoining mechanism of broken ends, reopen the problem.

[7] C. AUERBACH and H. MOSER, Z. Vererbungslehre *85*, 479 (1953).
[8] A. F. E. KHISHIN, Z. Vererbungslehre *87*, 97 (1955).
[9] G. PONTECORVO, D. I. S. *18*, 54 (1944).
[10] H. J. MULLER, *Radiation Biology* (McGraw-Hill Co. 1954), vol. 1, p. 565.
[11] J. M. THODAY and J. READ, Nature *163*, 133 (1949).
[12] S. WOLFF, Radiation Res. *1*, 453 (1959).
[13] S. WOLFF, Genetics *39*, 356 (1954).
[14] S. WOLFF and K. C. ATWOOD, Prod. Nat. Acad. Sc. *40*, 187 (1954).

In our data on the oxygen-exposed males, before, during and after X irradiation at various doses, we found the oxygen effect present in the lower doses 150 and 300 r but only in the highest mutation rate stage (Table III). We found for the 600 r dose an oxygen effect spread here and there in the mature sperm zone and in the meiotic zone. At highest doses (1200 and 2400 r) the effect is spread throughout the whole spectrum of spermatogenesis studied.

The explanation of this result through the formation of peroxides is untenable, since there was oxygen effect in the anoxic zone of mature spermatozoa at higher doses. On the other hand, if the effect of oxygen was due to differential rejoining of affected chromosomes, then it would be subjected to the dose[12] although it could be independent of the number of breaks induced. Therefore, oxygen affects not the primary breakage but some mechanism which controls the rejoining of broken ends. Work is in process which will attempt to clarify the nature of such a mechanism of damage.

Riassunto. Gli esperimenti qui riferiti sono di due tipi: a) per la determinazione dello spettro di sensibilità di cellule germinali maschili durante le fasi meiotiche e mature (spermatozoi) di *Drosophila melanogaster*, irradiate con 5 differenti dosi di raggi X in condizioni differenti; b) per lo studio dell'effetto dell'ossigeno. Il risultato fu una aumentata mutabilità in O_2, ma non in tutti gli stadi della spermatogenesis, poiche le fasi meiotiche diedero maggiori frequenze di mutazioni recessive che non gli spermatozoi maturi. Quando l'effetto dell'ossigeno si combina con basse dosi di raggi X la mutabilità aumenta solo nelle cellule che si trovano in fasi meiotiche. Questa nuova osservazione viene interpretata come effetto dell'O_2 sulla possibilità di riattacco fra roture piuttosto che come effetto primario sulle rotture stesse.

H. F. HOENIGSBERG[15],
E. GALLUCCI, and A. GIAVELLI[16]

Istituto di Genetica, Università di Milano (Italy), September 8, 1960.

[15] Present address: Genetics Laboratory, University of the Andes, Bogotà (Colombia).

[16] The senior author wants to express his thankfulness to Professor C. BARIGOZZI for reading the manuscript and for his hospitality. This investigation was supported by the Comitato Nazionale per le Ricerche Nucleari of Italy.

The Effect of Fusaric Acid on the Oxidative Phosphorylation of Plant Mitochondria

Fusaric acid (5-butyl-2-picolinic acid) is a toxin produced by *Fusarium lycopersici* Sacc. *in vitro*[1]. It has also been identified in diseased plants infected with this fungus[2] and, therefore, fulfils all the criteria laid down for a vivotoxin[3]. Fusaric acid also shows vivotoxicity in the cotton wilt disease[4].

Fusaric acid exhibits a pleiotropic mode of action[5,6], i.e. it affects the host cells in more than one way. Thus the toxin causes a disturbance in the permeability of the host cells[5,7] and at higher concentrations (10^{-3} *M* to 10^{-2} *M*) inhibits respiration[8]. The inhibition of respiration at higher concentrations is no doubt caused by an inhibition of the cytochrome oxidase system[9]. In diseased plants, however, the concentration of fusaric acid[6] probably does not reach 10^{-4} *M* and there is no significant decrease in the oxygen uptake of the diseased tomato leaves[8,10].

ALLEN[11] had earlier postulated the role of phytotoxins in general as uncouplers of oxidative phosphorylation. Perhaps some evidence in favour of this hypothesis has come from studies where it has been demonstrated that diseased tissues do not respond to the uncoupling effect of 2,4-dinitrophenol to the same extent as the healthy tissues[11–13]. In some instances it has also been demonstrated that inorganic phosphate accumulates during disease development[11]. BACHMANN[14], studying the effect of fusaric acid on the permeability of plant cells, came to the conclusion that the pyridine ring in the fusaric acid molecule is responsible for the inhibition of oxidative phosphorylation and consequently the non-osmotic water uptake mediated by this system.

We have now been able to demonstrate the inhibition of oxidative phosphorylation in isolated plant mitochondria by fusaric acid. Mitochondria were isolated from both tomato hypocotyls[9] and cauliflower buds[15]. For the isolation of tomato mitochondria, surface sterilized seeds of Bonny Best variety were grown on sterilized Vermiculite trays in the dark at 25°C for four days. The etiolated seedlings were harvested and the hypocotyls separated from the cotyledons and the roots. The chilled material was macerated at 2°C and extracted with 5 vol of a buffer

Effect of different concentrations of Fusaric acid on the oxidative phosphorylation and respiration of mitochondria isolated from tomato hypocotyls.

Mitochondria isolated in 0.5 *M* sucrose + 0.066 *M* phosphate + 10^{-3} *M* EDTA, pH 7.0. Warburg vessels contained 20 μM ATP, 100 μM glucose, 2 mg hexokinase, 25 μM K_2HPO_4, 20 μM EDTA, 5 μM $MgSO_4$, 20 μM NaF, 0.33 mg DPN, 0.1 mg cytochrome C, 0.5 ml mitochondria, Fusarc iacid and distilled water to make up a total of 2.8 ml, pH 6.8. Respiration measured for 30 min.

Concentration of inhibitor	Q_{O_2}	μM P esterified/ mg *N*/h	P:O	% inhibition
Control	236	41.6	1.98	—
1×10^{-3} *M* Fusaric acid	152	18.2	1.35	31.2
5×10^{-4} *M* Fusaric acid	200	25.8	1.45	26.0
2.5×10^{-5} *M* Fusaric acid	232	35.0	1.70	13.4

[1] E. GÄUMANN, ST. NAEF-ROTH, and H. KOBEL, Phytopath. Z. *20*, 1 (1952).
[2] H. KERN and D. KLUEPFEL, Exper. *12*, 181 (1956).
[3] A. E. DIMOND and P. E. WAGGONER, Phytopathology *43*, 229 (1953).
[4] K. LAKSHMINARAYANAN and D. SUBRAMANIAN, Nature (Lond.) *176*, 697 (1955).
[5] E. GÄUMANN, Phytopath. Z. *32*, 359 (1958).
[6] B. D. SANWAL, Proc. IX Internat. Bot. Congress, Montreal (1959).
[7] E. GÄUMANN, H. KERN, H. SCHÜEPP, and W. OBRIST, Phytopath. Z. *32*, 225 (1958).
[8] ST. NAEF-ROTH, Z. Pflanzenkr. *64*, 421 (1957).
[9] R. PAQUIN and E. R. WAYGOOD, Canad. J. Botany *35*, 207 (1957).
[10] R. P. COLLINS and R. P. SCHEFFER, Phytopathology *48*, 349 (1958).
[11] P. J. ALLEN, Phytopathology *43*, 221 (1953).
[12] M. SHAW and D. J. SAMBORSKI, Canad. J. Botany *35*, 389 (1957).
[13] G. FARKAS and Z. KIRALY, Physiol. Plantarium *8*, 877 (1955).
[14] E. BACHMANN, Phytopath. Z. *27*, 255 (1956).
[15] G. LATIES, Plant Physiology *28*, 557 (1953).

consisting of 0.5 *M* sucrose, 0.066 *M* phosphate and 0.001 *M* EDTA, pH 7.0. The homogenate was centrifuged at 0°C for 15 min in a refrigerated centrifuge at 500 *g*. The supernatant was again centrifuged for 20 min at 18400 *g*. The resulting pellet was washed twice with cold sucrose buffer and finally suspended in 1/10 of the original volume of the buffer used for extraction.

Respiration was measured in Warburg respirometers and inorganic phosphate was determined by the method of Fiske and Subbarow[16]. Additions to the reaction vessel and conditions of the experiments are given in the Table. Hexokinase, glucose and fusaric acid were added at zero time from the side-arm of the vessel.

The Table shows the results of this investigation. At higher concentrations, fusaric acid inhibits both the oxygen consumption and the coupled phosphorylation, but at lower concentrations the oxygen is not inhibited at all, although there is some inhibition of orthophosphate esterification. Fusaric acid thus acts as a partial uncoupler of oxidative phosphorylation.

It is not certain how much of this property of fusaric acid is contributory to the vivotoxicity of the toxin; it is doubtful if it has anything to do with the augmented respiration of the diseased tomato plants during the first days after infection. This initial increase of leaf respiration may be caused by the iron complex of the parasitogenic toxin lycomarasmin[8].

Zusammenfassung. Die Fusarinsäure (ein von pflanzenparasitischen Pilzen gebildetes Toxin) verursacht in Mitochondrien eine Hemmung und teilweise Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung. Die Bedeutung dieser Befunde für die Pathogenese pflanzlicher Welkekrankheiten wird diskutiert.

B. D. Sanwal and E. R. Waygood[17]

Department of Botany, University of Manitoba, Winnipeg (Canada), February 7, 1961.

[16] C. H. Fiske and Y. Subbarow, J. biol. Chem. *66*, 375 (1925).

[17] This work was done while the senior author was a post-doctoral fellow of the National Research Council of Canada.

A Biochemical Mechanism for the Production of Abnormal Tetrad Ratios

Abnormal tetrad ratios have been most clearly observed in *Saccharomyces*[1,2] and *Neurospora*[3–5]. A superficially similar phenomenon, occurring with much higher frequency, occurs in *Zea mays*[6,7]. In *Neurospora*, what has been observed is a change from mutant to wild-type of a gene section (muton) when a tetrad is produced by a diploid cell containing two closely-linked mutant gene sections in the trans configuration. The resultant tetrad contains three mutant chromosomes and a wild-type chromosome with no chromosome containing both mutant gene sections, as would be expected if crossover accounted for the wild-type. The frequency of this occurrence is much larger than the back-mutation frequency, as determined with asexual spores, so it appears that the normal allele is necessary for the change to occur. There has been, as far as I know, no published theory to account for this on the biochemical level.

Fundamental to any such theory is an assumption about the character of the mutational event that can be repaired. One of the simplest biochemical hypotheses would be that the amine group of a purine or pyrimidine is replaced through hydrolytic deamination by a hydroxyl group. Such a reaction could be carried out by nitrous acid *in vitro*, as has been demonstrated by Schuster and Schramm[8]. Mutations have been produced by nitrous acid treatment of isolated tobacco mosaic virus[9], T_2 phage[10] and the DNA of *Pneumococcus*[11]. An effort was made in this laboratory to determine if ultraviolet light would also cause deamination. Solutions containing 0.25 g/l adenosine were irradiated with a 'Uviarc' ultraviolet light, diluted 1/100 in 0.1N HCl and analyzed at 250, 260, and 270 mμ with a Beckmann DU spectrophotometer. The results are illustrated in Figure 1. In 8 *N* NaOH, considerable deamination occurred. At lower pH's, or without irradiation, no deamination occurred beyond the initial and practically instantaneous quantity which can be seen at time 'zero' on the graph. It seems possible, therefore, that this mutagen may operate in part by a deamination mechanism. It should be noted, however, that there is no conclusive evidence that deamination is involved in mutation, nor is it easy to imagine how such evidence could be obtained.

Mutations of the type postulated could be reversed by replacement of the hydroxyl group by an amine group. To accord with the observations, the normal amine compound should be involved in the reaction. A similar phenomenon might be expected if the two bases were mixed in solution. For experimental purposes, the hypoxanthine-adenine pair seemed most appropriate, since only one hydroxyl group was present and only one product would be expected. Mixtures of adenine and hypoxanthine or of adenosine and inosine in concentrations of 10–500 γ/ml were dissolved in pH 6 buffer containing equimolar (1 *M* to 5 *M*) $(NH_4)_2HPO_4$ and $NH_4H_2PO_4$ and shaken under nitrogen at room temperature. Samples were withdrawn at 24 h intervals, diluted in 0.1 *N* HCl or 95% ethanol, and analyzed as before. Typical results are illustrated in Figure 2. Under these conditions, hypoxanthine is converted irreversibly to adenine and inosine to adenosine, the latter reaction being especially sensitive to O_2. Both reactions appeared to be third order, depending on the concentrations of both purines (or ribosides) and of ammonium ion. The rate constant for the conversion of hypoxanthine to adenine was $1.62 \pm 0.69 M^2$/h and for the inosine to adenosine reaction $0.20 \pm 0.08/M^2$h.

The mechanism proposed for this reaction (Fig. 3) is the condensation of the *keto* form of hypoxanthine with adenine to form a Schiff base which is cleaved with the addition of ammonia to give two molecules of adenine. The formation of Schiff bases in the pyrimidine series is known[12] but, as far as I know, there is no precedent for addition of ammonia thereto.

[1] C. C. Lindegren, Science *121*, 605 (1955).
[2] H. Roman and F. Jacob, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. *23*, 155 (1958).
[3] M. B. Mitchell, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. *41*, 935 (1955).
[4] P. St. Lawrence, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. *42*, 189 (1956).
[5] Y. Suyama, K. D. Munkres, and V. W. Woodward, Genetica *30*, 293 (1959).
[6] R. A. Brink, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. *45*, 819 (1959).
[7] E. H. Coe Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. *45*, 828 (1959).
[8] H. Schuster and G. Z. Schramm, Z. Naturforsch. *13 B*, 697 (1958).
[9] A. Gierer and K. W. Mundry, Nature *182*, 1457 (1958).
[10] W. Vielmetter and C. M. Weider, Z. Naturforsch. *14 B*, 312 (1959).
[11] R. M. Litman and H. Ephrussi-Taylor, C. R. Acad. Sci. *249*, 838 (1959).

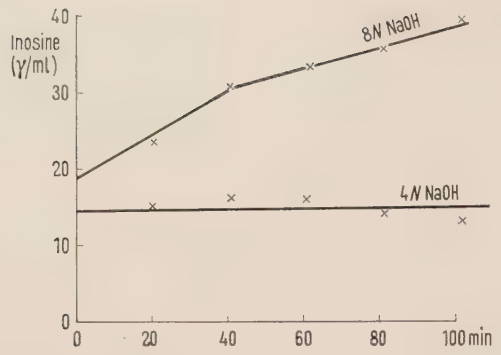


Fig. 1. 250 γ/ml adenosine was dissolved in NaOH solutions of the indicated strength and exposed to a 'Uviarc' lamp at 30°C. Samples were withdrawn at intervals, diluted 1/100 in 0.1 *N* HCl, and analyzed at 250, 260, and 270 mμ. The calculated inosine concentrations are indicated above. The calculated adenosine concentrations were such as to bring the total calculated concentration to 245–250 γ/ml.

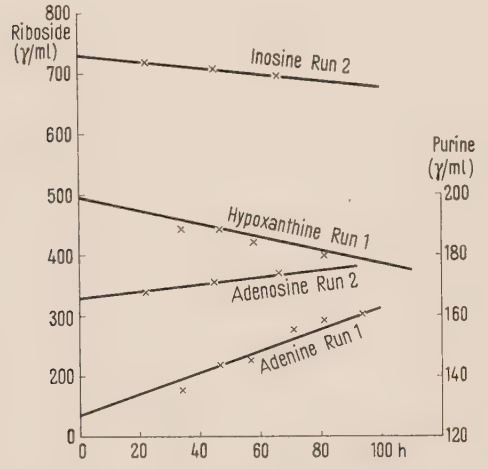


Fig. 2. Adenine and hypoxanthine (Run 1) or adenosine and inosine (Run 2) were dissolved in a solution containing 5 *M* $NH_4H_2PO_4$ and 5 *M* $(NH_4)_2HPO_4$ and shaken. Run 2 was under N_2. Samples were withdrawn at intervals and diluted in (Run 1) 0.1 *N* HCl or (Run 2) 95% ethanol. Samples were analyzed at 250, 260, and 270 mμ. The calculated concentrations of adenine and hypoxanthine (Run 1) or adenosine and inosine (Run 2) are shown.

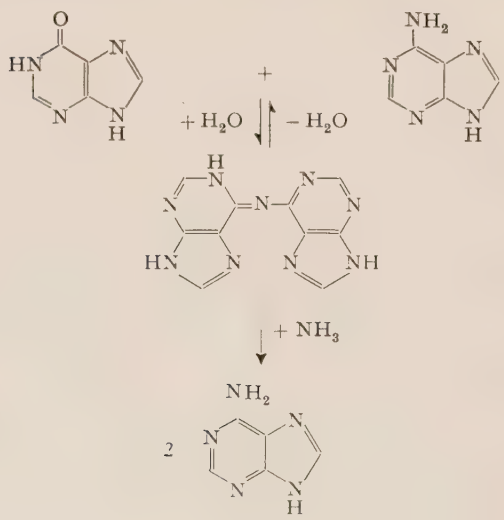


Fig. 3

If this type of reaction is to occur in the nucleus, between the wild-type and mutant gene segments, it is necessary that the two be in intimate contact. Such a situation is supposed in the 'Switch hypothesis' of FREESE[13] and may be the same as the intimate pairing postulated to account for negative interference[14,15] and that pairing involved in mitotic recombination[16]. This intimate contact cannot occur at zygotene, since at that point the chromosomes are too coiled and covered with matrix to permit the necessary close approach. Since, therefore, there is considerable evidence that pairing of some sort does occur between chromosomes at interphase, and since intimate contact of amino- and hydroxy-purine ribosides can lead to amination of the hydroxy-purine riboside, it seems possible that this reaction might account for the aberrant tetrads observed. The rate constants given indicate that the formation of a Schiff base and addition of ammonia thereto would occur as a rare event. The normal gene segment is certainly not the only available adenine compound in the nucleus. It is, however, the only one which there is reason to believe makes intimate contact with the mutant gene segment.

A reaction similar to that between adenine and hypoxanthine could be expected between xanthine and guanine. *In vitro*, such a mixture gave an unanalyzable product presumably containing, in addition to guanine and xanthine, isoguanine and 2,6-diaminopurine. No such reaction would be expected amongst the pyrimidines as the manner in which they are bound to the deoxyribose destroys the aromatic character of the ring and makes the Schiff base intermediate impossible.

Abnormal tetrads have been used for chromosome mapping and other evidence is consistent with the assumption that the greater the distance between the two mutons, the greater the probability of a wild-type product[5]. One possible explanation for this observation is that the unknown attractive force between chromosome segments depends on homology, and the presence of two dissimilarities within a small segment may seriously reduce the probability of any pairing at that region.

If this theory is correct, that mutation can be caused by deamination and the products can be changed back to the normal state by interaction with the normal purines, it would seem that mutations caused by an agent especially likely to cause such a reaction (such as nitrite) might be much more susceptible to conversion than those produced by such chemicals as the epoxides or by X-rays. Such an experiment is at least theoretically capable of being carried out and might be worth doing.

Zusammenfassung. Hydrolytische Deaminierung der Purinbasen ist eine mögliche Erklärung der beobachteten Mutation. Jene lässt sich *in vitro* durch HNO_2 oder durch Ultraviolettlicht in Gegenwart von Alkali erzielen. Die entstehenden Hydroxy-Purinbasen kann man durch Ammoniak in Gegenwart von Amino-Purinbasen reaminieren. Eine Theorie zur Erklärung des beobachteten Phänomens wird vorgeschlagen und genetische Folgen werden besprochen.

S. W. BOWNE JR.

Department of Biology, University of Wichita (Kansas), October 21, 1960.

[12] T. MATSUKAWA and K. SHIRAKAWA, J. Pharm. Soc. Japan *72*, 909 (1952).
[13] E. FREESE, Genetics *42*, 671 (1957).
[14] R. H. PRITCHARD, Heredity *9*, 343 (1955).
[15] E. CALEF, Heredity *11*, 265 (1957).
[16] G. PONTECORVO, Advanc. Genet. *5*, 225 (1953).

Changes in DNA and RNA during Embryonic Development of the Merogonic Combination *Triton palmatus* (♀) × *Triton cristatus* (♂)[1]

In a number of previous studies BALTZER[2–4] and HADORN[5–7] investigated in detail the morphogenetic capacities of the merogonic combination *Triton palmatus* (♀) × *Triton cristatus* ♂. According to these two authors, the (p)c merogone develops at best to an early embryo with neural tube and eye vesicles, and then dies with a localized pycnosis in the head mesenchyme. We know, however, very little about the biochemical properties of this androgenetic haploid hybrid. ZELLER[8] carried out an extensive study on the synthesis of ribonucleic acid (RNA) in the (p)c embryos. He showed that there is a rapid increase in RNA during the development of the merogone. Obviously the *cristatus* nucleus is able to synthesize RNA, which, however, cannot be utilized by the *palmatus* cytoplasm. Changes in desoxyribonucleic acid (DNA) were not investigated.

Very recently, by using a modified microchemical method, CHEN[9] analyzed the synthesis of both DNA and RNA during the normal embryonic development of *T. alpestris*, *T. palmatus*, and *T. cristatus*. In general, his results revealed that the DNA content keeps a constant value until the late blastula stage and new synthesis begins shortly before gastrulation; during gastrulation and neurulation, the DNA increase is especially rapid. A similar situation was found for RNA: its synthesis does not take place until the end of blastulation. The increase in RNA during gastrulation and neurulation is, however, slow compared to that in DNA.

The microchemical method described by CHEN[9] is sensitive enough for estimating the nucleic acids in half an embryo. The procedure involves the differential extraction of DNA and RNA by perchloric acid and the contents determined by spectrophotometry using micro-attachments for Beckman model DU. It would be of interest to follow the synthesis of both nucleic acids in the (p)c merogones by using this new method. The main point here is to find out whether the *cristatus* nucleus can make use of materials in the cytoplasm of another species to form new DNA and RNA. Since haploid hybrids which reach advanced stages are very rare, our data are limited, and the present paper should be considered as a preliminary report on this problem.

The technique of obtaining merogonic hybrids was similar to that described by previous authors (BALTZER[2–4], HADORN[5–7], and ZELLER[8]), except that for enucleation, a fine needle was inserted into the glass micropipette so that the unfertilized *palmatus* egg could be pricked and the egg nucleus removed in the same procedure (Fig. 1). Embryos of desired stages were cut into two equal sagittal halves, the one half being used for the chemical analysis and the other half squashed on a slide and stained with orcein-acetic acid for counting the chromosomes. In addition to hybrid embryos identified as haploid, individuals with the diploid number of chromosomes were also found; these apparently were due to an unsuccessful enucleation. We shall refer to these embryos as operated diploid pc hybrids (op.pc), while those which had not been subjected to the enucleation procedure will be termed normal diploid pc hybrids (nor.pc). Both types of embryos served as controls. The developmental periods chosen for the nucleic acid analysis were as follows: (1) late blastula to early gastrula aged about 25–34 h after fertilization, (2) early to late neurula at 60–78 h of age and (3) early embryo with neural tube and eye vesicles at 85–98 h of age. We have examined altogether 68 haploid and diploid

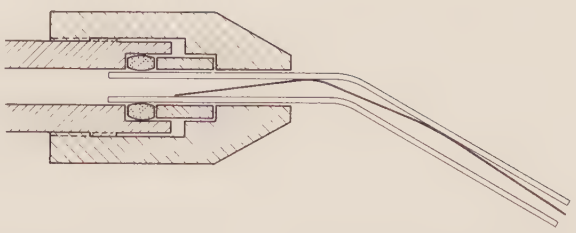


Fig. 1. Glass micropipette with a fixed fine needle for pricking the egg and removing the egg nucleus in the same procedure. The micropipette is fastened to a metallic holder (shown by the hatched part in the sketch) used in the transplantation technique for *Drosophila*. The holder is connected to a hypodermic syringe by a plastic capillary tubing (not shown in the Figure). The whole apparatus is filled with water during operation. By manipulating the syringe, the egg nucleus together with some cytoplasmic material can be sucked into the micropipette immediately after pricking.

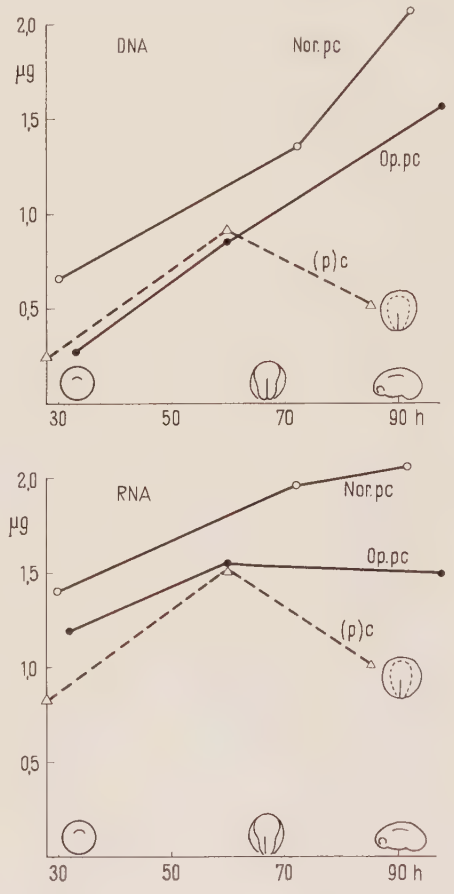


Fig. 2. Pattern of DNA and RNA synthesis in haploid (p)c merogones (△), normal (○), and operated (●) diploid pc hybrids. Ordinate: nucleic acid content ($\mu g/^1/_2$ embryo). Abscissa: developmental age in h after fertilization at 18°C.

[1] The present study was supported by a grant from the KARL-HESCHELER-Stiftung.

[2] F. BALTZER, Rev. suisse Zool. *37*, 333 (1930).
[3] F. BALTZER, Naturwiss. *28*, 177 (1940).
[4] F. BALTZER, XIIIe Congres int. Zool. (1949), p. 234.
[5] E. HADORN, Rev. suisse Zool. Roux Arch. *125*, 495 (1932).
[6] E. HADORN, Roux Arch. *131*, 238 (1934).
[7] E. HADORN, Roux Arch. *136*, 400 (1937).
[8] CH. ZELLER, Roux Arch. *148*, 311 (1956).
[9] P. S. CHEN, Exp. Cell Res., in press (1960).

embryos. Among these only 10 merogones, 18 normal and 6 operated pc hybrids were found to be healthy and could be used for evaluation of the DNA and RNA data. The number of chromosomes in these embryos could be estimated with certainty.

Results. Our over-all data on DNA and RNA are presented in the Table and the average values for the three developmental periods mentioned in the previous section are summarized in Figure 2. As can be seen from the Table there are certain variations in the nucleic acid contents in embryos of about the same age, but the general pattern of DNA and RNA increase in the three types of embryos is evident. In the normal diploid pc hybrids (nor.pc), there is a continuous increase of DNA from late blastula until the early embryo stage (Fig. 2). Considering that the development of this hybrid combination is normal, this increase is understandable. In the previous study of CHEN[9], it has been shown that the DNA content of both parental species also rises rapidly during the same developmental period. The operated diploid pc hybrids (op. pc) show the same pattern of DNA increase, although its absolute amount is distinctly lower than that in the normal hybrids. It should be mentioned that during enucleation a part of the egg cytoplasm was removed. The operated embryos are thus smaller than the non-operated pc controls. Also, from earlier studies, it is known that in the amphibian egg there is a large cytoplasmic store of DNA (for literature see CHEN[9]). This seems to be the reason why the absolute quantity of DNA is lower in the operated diploid hybrids. In the hybrid merogones, there is a distinct increase of DNA from late blastula to mid-neurula stage. However, after this stage there seems to be no increase in the DNA content. To what extent this is due to cell degeneration, during later development, is uncertain. As shown by the curves in Figure 2, during the period from late blastula to mid-neurula the haploid (p)c merogones have about the same amount of DNA as the operated diploid pc hybrids. Considering that the nuclei of the diploid individuals contain twice the number of chromosomes as the haploid ones, this result is not to be expected. We have counted the number of nuclei in sections of one pc diploid and one (p)c merogonic embryo. This showed that these are on the average 4.94 nuclei per unit area in the pc control and 8.43 in the (p)c merogone. Apparently there is an adjustment in nuclear number, compensating for the decrease in nuclear size. In anurans HERTWIG[10] found twice the normal cell number in haploid gastrulae. Very recently, such a regulation was also recorded for diploid and triploid individuals of the fish *Gasterosteus aculeatus* (SWARUP[11]). The problem of the relation of cell number to cell size has been discussed in detail by FANKHAUSER[12].

Age, development and nucleic acid contents of haploid (p)c merogones, operated (op) and normal (nor) diploid pc hybrid embryos

Embryo type	Age in h after fertilization	Development[a]	RNA ($\mu g/^1/_2$ embryo)	DNA ($\mu g/^1/_2$ embryo)
(p)c	25.5	8+/H/N	0.85	0.39
	25.5	8+/H(+)/N	0.96	0.42
	27	8+/H/N	0.76	0.12
	27	8+/H(+)/N(±)	0.86	0.26
	27	8+/H(+)/N	0.80	0.24
	27	8+/H/N	0.68	0.24
	34	9–10/H/N(±)	0.88	0.12
	60	12c/H(+)/S	1.47	0.77
	60	13/H/N(±)	1.59	1.01
	85	13/H/S	1.06	0.51
pc(op.)	33	11a/D/N	1.23	0.35
	33	11a/D/N(±)	1.14	0.18
	60	13/D(+)/N(±)	1.63	0.92
	60	13/D(−)/N	1.46	0.81
	98	15/D/N	1.31	1.28
	98	21/D(+)/N	1.59	1.86
pc(nor.)	25.5	8+/D/N	1.26	0.72
	27	8+/D/N	1.37	0.92
	27	8+/D/N	1.10	0.43
	33	9–10/D/N	1.84	0.49
	33	9–10/D/N	1.88	0.65
	34	11b/D/N	1.10	0.74
	34	11b/D/N	1.28	0.69
	60	15/D/N	1.82	1.40
	60	15/D/N	2.04	1.25
	78	15/D/N	1.96	1.34
	78	15/D/N	1.96	1.33
	78	15/D/N	1.94	1.27
	78	15/D/N	2.16	1.59
	85	23/D/N	2.52	2.22
	85	23/D/N	2.02	1.83
	94	21/D/N	1.73	1.81
	98	19/D/N	2.29	2.88
	98	19/D/N	1.73	1.72

[a] The numbers in this column refer to Harrison's developmental stages for *Amblystoma punctatum*. H and D indicate haploid and diploid number of chromosomes respectively. '+' and '−' show that small variations in the number of chromosomes were counted. *N* means that the developmental state of the embryo was normal, while S indicate that sticky, possibly degenerated, cell materials were observed in the inside of the embryo.

The pattern of RNA synthesis for the three types of hybrids is also shown in Figure 2. In the normal pc hybrids (nor.pc), there is a gradual increase of RNA from late blastula to embryo with eye vesicles. However, the magnitude of increase is less compared with that of DNA, especially at later stages. This difference was also found for the two parental species (CHEN[9]). In a similar way the operated pc hybrids show a steady increase in RNA, but the total quantities are again markedly lower than those of the normal diploid pc hybrids at corresponding stages, apparently again due to removal of egg cytoplasm during enucleation. In the hybrid merogones we observed a definite increase of RNA during gastrulation and neurulation. Our data indicate that at the midneurula stage the (p)c embryos are at least as rich in RNA as the operated pc individuals. This result confirms the earlier findings of ZELLER[8] that active synthesis of RNA takes place during the early development of the haploid androgenetic hybrid. Only at about 90 h of age, its RNA content seems to be lower. Further work is needed to ascertain how far the inhibition of RNA formation at such a later stage is due to a general impairment of morphogenetic development of this merogonic combination.

The present study demonstrates that, at least up to the midneurula stage, the *cristatus* nucleus is able to utilize precursors in the *palmatus* cytoplasm to synthesize both DNA and RNA.

Zusammenfassung. Der Gehalt an RNS und DNS früher Entwicklungsstadien des Bastardmerogons *Triton palmatus* (♀) × *Triton cristatus* ♂ wurde gemessen. Es zeigt sich, dass trotz der Kern-Plasmadisharmonie diese letale Kombination in der Lage ist, beide Nukleinsäuren zu synthetisieren.

P. S. CHEN and CH. ZELLER

Zoologisches Institut der Universität Zürich (Switzerland), January 20, 1961.

[10] G. HERTWIG, Arch. mikr. Anat. *81*, 87 (1913).
[11] H. SWARUP, J. Gen. *56*, 143 (1959).
[12] G. FANKHAUSER, Quart. Rev. Biol. *20*, 20 (1945).

Umkehr der Keimstreifpolarität in Eifragmenten von *Euscelis* (*Cicadina*)

Der in Form und Architektur gewöhnlich gut ausgeprägten Vorn-Hinten-Polarität des ablagereifen Insekteneies entspricht eine Polarität des embryonalen Blastoderms, die eindeutig in der Segmentfolge des Keimstreifs zum Ausdruck kommt und sich auch in isolierten Eiteilen durchsetzt[1–4]. Aus Isolations- und Kombinationsversuchen war geschlossen worden, dass im Ei der Kleinzikade *Euscelis plebejus* Fall. das Entwicklungsschicksal der segmentbildenden Blastodermregion primär bestimmt wird durch das entlang der Eiachse graduell sich verändernde Verhältnis von Einflüssen aus der Hinterpolregion zu Einflüssen aus dem Bereich am Ende des vorderen Eidrittels[5]. Wird dieses Verhältnis im segmentbildenden Eibereich durch Verlagern von Hinterpolmaterial (HPM) verändert, so müsste sich dies auf die räumliche Folge der Keimstreifsegmente auswirken. Zur Prüfung dieser Möglichkeit wurde HPM einschliesslich des Symbiontenballes in der früher beschriebenen Weise[5] innerhalb der hinteren $^2/_3$ des Eies nach vorne verlagert und das Ei anschliessend nicht hinter[5], sondern unmittelbar vor dem verlagerten Material durchschnürt. Die Operation erfolgte während der Furchung, um die Einflüsse aus dem vorderen Eidrittel auf ein Minimum zu beschränken. Zur Kontrolle wurden gleichzeitig Eier gleichen Alters und gleicher Herkunft ohne Verlagerung von HPM durchschnürt.

Die *Kontrolleier* verhielten sich wie die seinerzeit[4] geschnürten Eier. Das vordere Isolat, das weniger als $^2/_3$ des Eies umfasst, entwickelt sich extraembryonal. Das hintere Isolat bildet einen vollständigen Embryo oder, falls es erheblich weniger als $^2/_3$ des Eies enthält, hintere Keimstreifteile, deren Anfangssegment von der Isolatgrösse abhängt; im letzteren Fall verbleibt der vordere Abschnitt der Teilkeimanlage ventral auf dem Dotter und bildet nach hinten gerichtete Gliedmassenknospen aus, während das Keimstreifende in den Dotter einsinkt und die für das Abdomen typische U-Form annimmt (Fig. 1a, b).

Bei den vor verlagertem HPM geschnürten *Versuchseiern* entwickelte sich das vordere, von der Verlagerung nicht betroffene Isolat ebenfalls extraembryonal. Das hintere, wegen der Kombination von Ooplasma aus verschiedenen Eibereichen als Kombinat bezeichnete Eifragment starb in etwa der Hälfte der Fälle infolge von Operationsschäden ab oder enthielt undifferenziertes Embryonalgewebe. Die übrigen Kombinate entwickelten sich bis zur Bildung einer ventralen, meist von der Schnur bis zum Hinterpol reichenden Keimanlage wie die Kontrollisolate (Fig. 1c). Im weiteren Entwicklungsverlauf zeigten sich aber immer Abweichungen, die zu einem der folgenden 3 Ergebnistypen führten:

1. Bildung eines mit Labium oder Prothorax abschliessenden, *normal orientierten Keimstreifvorderteiles*. Dieser Typ trat nur nach Schnürung nahe dem Vorderende des mittleren Eidrittels auf und ist nach einer derartigen HPM-Verlagerung auch ohne Schnürung zu erwarten[5].

2. *Parallele oder longitudinale Mehrfachbildung* von Keimstreifabschnitten oder Segmenten.

3. *Teilkeimstreife mit* ganz oder teilweise *umgekehrter räumlicher Segmentfolge*. Dieser Ergebnistyp kündigt sich während der Entwicklung dadurch an, dass die Keimanlage am Vorderende des Kombinates in den Dotter einsinkt und dort die Abdominalkrümmung durchführt, während der auf dem Dotter verbliebene Keimstreifteil nach vorne gerichtete (Fig. 1d) oder gespaltene Gliedmassenknospen ausbildet; im letzteren Fall kann die Keimanlage auch am Hinterpol in den Dotter einsinken. Das eingesunkene Vorderende differenziert sich zu einem

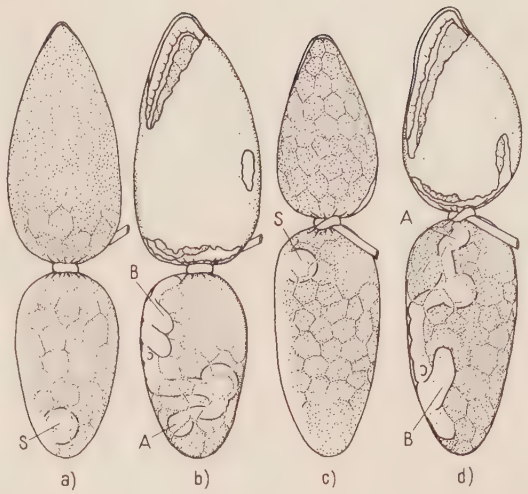


Fig. 1. Operierte Eier von *Euscelis plebejus*. Ventralseite links, Hinterpol unten. a, b Kontrollschnürung E 2329. a: Alter 2 Tage. Hinter der Schnur Dotterfurchung und ventrale Keimanlage, im vorderen Isolat beginnende Dotterfurchung. b: Alter 9 Tage. Hinter der Schnur 2 Thorakalsegmente, Abdomenende hinten im Dotter. Vorderes Isolat weitgehend von reflektierendem Tapetum ausgekleidet, Deckel links vorne. c, d Schnürung dicht vor verlagertem Hinterpolmaterial, E 2770. c: Alter 3 Tage. Dotterfurchung vollendet, Keimanlage ventral hinter der Schnur. d: Alter 7 Tage. Hinten 1 Thorakalsegment, Abdomenende vorne im Dotter. Vorderes Isolat wie b.
A = Abdomenende mit Proctodaeum, B = Thorakalbeinknospe, S = Symbiontenball. Zeichenspiegel, Vergr. ca. 50×.

Fig. 2. Hintere Eifragmente von *Euscelis plebejus* nach Fixierung im Keimstreifstadium, gefärbt mit Thionin. Orientierung wie Figur 1. a: Kontrollisolat E 2207, Keimstreifanfang Maxillarsegment. b: Kombinat E 2157 mit revertiertem Teilkeimstreif, Anfang Mesothorax (hinten!). c: Kombinat E 2119 mit spiegelbildlich longitudinalverdoppeltem Teilkeimstreif. Symmetrieebene im Methathorax, dessen distal gespaltene Beine nach vorne und hinten zeigen. Im Dotter zwischen den beiden Abdomina der heller gefärbte Symbiontenball, der auch in a und b dem Abdomen ansitzt.
Mikrophoto, Vergr. ca. 90×.

[1] F. Seidel, E. Bock und G. Krause, Naturw. *28*, 433 (1940).
[2] G. Krause, Symp. Internat. Inst. of Embryology Pallanza, im Druck.
[3] M. Schnetter, Wilhelm Roux' Arch. Entw.-Mech. Org. *131*, 285 (1934).
[4] K. Sander, Wilhelm Roux' Arch. Entw.-Mech. Org. *151*, 430 (1959).
[5] K. Sander, Wilhelm Roux' Arch. Entw.-Mech. Org. *151*, 660 (1960).

Proctodaeum, dem nach hinten Abdomen und 1–2 Thorakalsegmente folgen (Fig. 2b). Daran kann sich ein identischer Keimstreifteil mit normaler ränmlicher Segmentfolge anschliessen (Fig. 2c), dessen letzte Abdominalsegmente allerdings oft unterentwickelt sind[6]. Die Symmetrieebene zwischen dem Teil mit umgekehrter und demjenigen mit normaler Polarität kann im Mesothorax, Metathorax oder in einem Abdominalsegment liegen. Eine solche Verdoppelung mit transversaler Symmetrieebene trat früher schon einmal auf[5] und ist kürzlich durch Zentrifugieren auch bei Chironomiden-Eiern erzielt worden[7]. Vollständig revertierte Teilkeimstreife unterscheiden sich in der Segmentzahl signifikant von Keimstreifstücken aus Kontrollisolaten gleicher Grösse (Fig. 2a, b); die Umkehr kann daher nicht auf blastokinetischen Bewegungen beruhen.

Das ooplasmatische Reaktionssystem von *Euscelis* gestattet demnach ausser achsenkongruenter Longitudinalverdoppelung grosser Keimstreifteile[5] auch die *spiegelbildliche Longitudinalverdoppelung* und die *vollständige Reversion* der hinteren Keimstreifhälfte. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass Reihenfolge und Charakter der Keimstreifsegmente durch ein während Furchung und Blastodermbildung noch plastisches Gefällepolaritätssystem prädisponiert werden, ehe die metamere Selbstgliederung des Blastoderms einsetzt.

Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse folgt an anderer Stelle.

Summary. In the leaf-hopper *Euscelis*, the spatial sequence of germ band segments can be reverted partially or completely by translocation of hind pole material to the front end of an egg fragment. Head and prothorax are suppressed by this operation.

K. SANDER[8]

Zoologisches Institut der Universität Würzburg (Deutschland), 22. Dezember 1960.

[6] K. SANDER, Symp. Internat. Inst. of Embryology Pallanza, im Druck.
[7] H. YAJIMA, J. Embr. exp. Morph. *8*, 198 (1960).
[8] Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für weitgehende Unterstützung.

Dégénérescence rétinienne expérimentale provoquée par le fluorure de sodium

La production expérimentale de dégénérescences rétiniennes présente un grand intérêt pour l'étude de la pathogénie des rétinites pigmentaires humaines. Des différents produits utilisés à cette fin, les plus intéressants et les plus réguliers dans leur action sont:

1. L'*iodate de Na*, dont le mécanisme d'action est inconnu; il ne provoque pas, habituellement, de lésions dans d'autres organes, sauf à fortes doses.

2. Le *dithizone*, qui est un diabétogène, mais provoque simultanément de graves perturbations dans tout le métabolisme protéinique et lipidique. Peu d'animaux survivent à une injection. Il semble agir, au niveau de la rétine, par des modifications du métabolisme des hydrates de carbone.

3. Le *monoïodacétate*, qui agit vraisemblablement comme inhibiteur de la glycolyse.

D'une série d'expériences antérieures (KARLI[1], BABEL et ZIV[2]), il semblait que d'autres inhibiteurs de la glycolyse demeurassent sans effet durable sur la rétine: glyceraldéhyde, phlorizine, fluore de Na. Seul ce dernier paraissait agir sur l'ERG du lapin, passagèrement; les potentiels a et b en étaient augmentés, mais de façon inconstante.

Nous avons repris, il y a quelques mois, ces expériences, en modifiant la technique d'administration et surtout le dosage (doses jusqu'à 60 mg/kg). Entre temps, PONTE[3], puis SORSBY et HARDING[4] ont étudié le même problème et réussi à provoquer des lésions rétiniennes au moyen d'injections intraveineuses de fluorure de Na. PONTE a obtenu des résultats chez tous ses animaux traités par le fluorure de Na, et chez quelques-uns de ceux à qui il a administré de la phlorizine. SORSBY et HARDING, en revanche, n'observent d'altérations rétiniennes, après une seule injection de fluorure, que chez 17 animaux sur 115. L'action de toxique serait facilitée par un jeûne préalable ou par l'hypoglycémie insulinique, de même que par le prétraitement au dinitrophénol.

Nos recherches portent sur 8 lapins; 4 ont reçu 6 à 14 injections de fluorure de Na quotidiennes, à la dose de 40 mg/kg, 1 a reçu 2 injections de 50 mg/kg et 3 de 2 à 3 injections de 60 mg/kg en 2 à 4 jours. Les résultats de ces différents dosages sont à peu près équivalents; il n'est pas certain que la répétition d'injections ait une influence plus importante qu'une seule, sauf pour la dose de 40 mg/kg. Les doses inférieures sont inefficaces. Tous les animaux ont réagi par des modifications ophtalmoscopiques, électrorétinographiques et histologiques, sans que nous ayons eu besoin de faire intervenir d'autres facteurs tels que l'hypoglycémie.

Les phénomènes mis en évidence sont les suivants:

1. *Examen ophtalmoscopique:* apparition d'un œdème parfois diffus, le plus souvent localisé à la région située sous la papille. Cet œdème est visible à partir du 3ème jour, il s'efface en 3 ou 4 jours. Quand il a disparu, il laisse à la rétine un aspect marbré et, parfois, mais pas toujours, une pigmentation localisée sous la papille en petites taches non confluentes. Cet aspect, une fois constitué, ne semble pas se modifier (la plus longue durée d'observation est de 4 mois) (Fig. 1).

2. *Contrôle ERG:* il a mis en évidence des altérations importantes de la fonction rétinienne, mais réversibles.

a) Dans les minutes qui suivent l'injection, augmentation du potentiel *b* modérée (20–40 μv) (Fig. 2).

b) Dans les jours suivants, abaissement progressif du potentiel *b* qui diminue jusqu'à atteindre la moitié ou le quart de sa valeur initiale. Le maximum de l'abaissement s'observe entre le 5ème et le 7ème jour (Fig. 3).

Chez un seul animal, l'ERG a été aboli complètement; il s'agissait d'un cas où l'œdème était très important et permanent.

Après le 5ème ou le 7ème jour, le potentiel *b* remonte lentement et regagne, en une semaine environ, sa valeur initiale. Le potentiel *a* n'a pas subi de modifications notables.

3. *Contrôle histologique:* il existe.

a) Au début, un *œdème diffus* de toutes les couches rétiniennes, même les internes; en même temps, le neuroépithélium commence à se désintégrer.

[1] P. KARLI, Ophthalmologica *128*, 137 (1954).
[2] J. BABEL et B. ZIV, Ophthalmologica *132*, 65 (1956).
[3] F. PONTE, G. italiano di Oftalmologia *11*, 350 (1958).
[4] A. SORSBY et R. HARDING, Brit. J. Ophthal. *44*, 213 (1960).

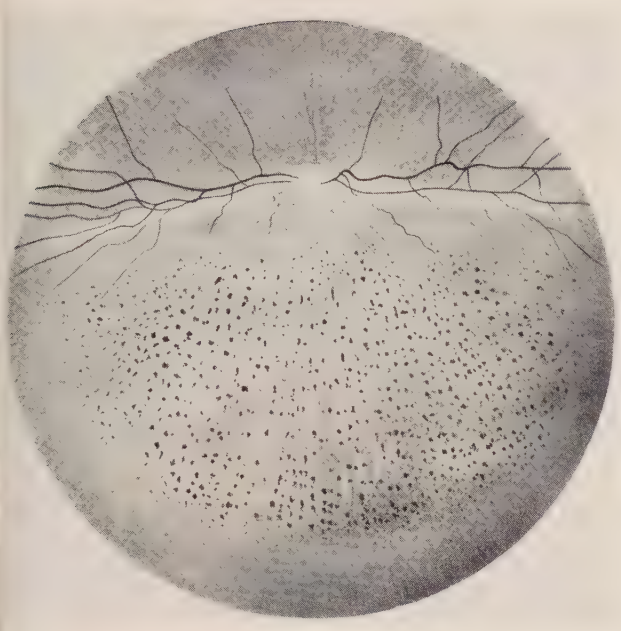


Fig. 1. Dégénérescence rétinienne expérimentale. Intoxication par le Fluorure Na (50 mg/kg, 2 injections).
Aspect du fond de l'œil après 3 semaines.

b) Quand l'œdème a disparu, la désintégration du neuro-épithélium se poursuit. A noter qu'elle reste localisée à la région sous-papillaire et respecte la périphérie. Il se forme des adhérences entre neuroépithélium et épithélium pigmenté, donnant un aspect d'arcades. L'épithélium pigmenté se modifie également: alternance de prolifération et raréfaction.

Pas de phénomènes inflammatoires infiltratifs ou exsudatifs. Les couches internes sont respectées.

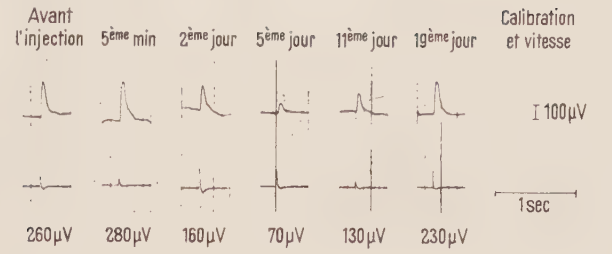


Fig. 2. Évolution de l'ERG dans les minutes qui suivent l'injection

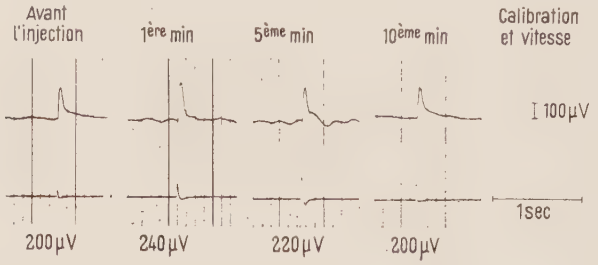


Fig. 3. Évolution de l'ERG dans les jours qui suivent l'injection. Diminution régulière du potentiel b pendant les 5 premiers jours, puis retour à la normale.

Zusammenfassung: Die Einspritzung von NaFl beim Kaninchen verursacht Netzhautveränderungen, welche der *Retinitis pigmentosa* ähnlich (Fundus, ERG, Histologie), aber auf einen Bezirk beschränkt sind.

J. Babel et C. Avanza

Clinique Ophtalmologique de l'Université de Genève (Suisse), le 14 décembre 1960.

The Incidence of Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Singapore

Susceptibility to drug induced haemolytic anaemia is known to be associated with deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase in erythrocytes (Carson, Flanagan, Ickes, and Alving[1]; Szeinberg, Sheba, and Adam[2]). This defect is common in American Negroes (Gross, Hurwitz, and Marks[3]) and amongst non-Askhenazic Jews (Szeinberg and Sheba[4]). Beutler, Yeh, and Necheles[5] recently studied 76 Chinese subjects by the glutathione stability test and suggested that the incidence of this defect is low in Chinese. However, several reports of haemolytic anaemia following ingestion of fava beans have appeared from China (Du[6]; Wang and Wang[7]; Chu, Ni, and Yang[8]). Chang[9] has reported on a clinical study of 228 cases of favism, while Bernard[10] has stated that: 'Favism is responsible for severe haemolytic anaemias with haemoglobinuria in many regions of China, mostly around Hang Chow'.

Between January and December 1959 an attempt was made to assess the frequency of this defect in Singapore. Blood samples were tested for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity by the method devised by Professor A. G. Motulsky and Dr. J. M. Campbell of the University of Washington in which the dye brilliant cresyl blue is used as an indicator of the reaction:

$$\text{Glucose–6–PO}_4 + \text{TPN} \rightleftharpoons \text{6–Phosphogluconic acid} + \text{TPNH}_2.$$

Under standard conditions, a time of decolourisation longer than 120 min was taken as definite evidence of absent or deficient enzyme activity. Decolourisation usually occurred between 30 and 70 min. The method has been described in detail (Vella[11]).

In all, 673 blood samples from adult male blood donors were tested. The results found in this group of people are summarised in Table I. An enzyme deficiency was found in 2.50% of Chinese, 3.33% of Indian, 37.50% of Jewish and 0.65% of Malay subjects. The Jewish subjects had originated from Iraq and Persia. No instance of enzyme

[1] P. E. Carson, C. L. Flanagan, C. E. Ickes, and A. S. Alving, Science *124*, 484 (1956).
[2] A. Szeinberg, C.Sheba, and A. Adam, Nature *181*, 1256 (1958).
[3] R. T. Gross, R. E. Hurwitz, and P. A. Marks, J. clin. Invest. *37*, 1176 (1958).
[4] A. Szeinberg and C. Sheba, Israel Med. J. *17*, 158 (1958).
[5] E. Beutler, M. K. Y. Yeh, and T. Necheles, Nature *183*, 684 (1959).
[6] Swun-deh Du, Chinese Med. J. *70*, 17 (1952).
[7] Wang Ch'i and Wang Ch'ng-Fang, Chinese J. Pediat. *7*, 139 (1956).
[8] Chu Chang-Liang, Ni Yang-Cheng, and Yan Ssu-Yiam, Chinese J. Pediat. *7*, 137 (1956).
[9] Chang Hsiao-Hsiang, Chinese J. Pediat. *10*, 63 (1959).
[10] J. Bernard, Blood *14*, 605 (1959).
[11] F. Vella, Med. J. Malaya *13*, 298 (1959).

Tab. I. Incidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Singapore

Ethnic group	Number studied	Number deficient	%
Chinese	240	6	2.50
Malay	155	1	0.65
Indian	132	4	3.33
European	80	—	—
Eurasian	27	1	—
Jew	16	6	37.50
Nepalese	14	—	—
Arab	4	—	—
Filipino	3	—	—
Turk	1	—	—
Puerto-Rican	1	1	—
Total	673	19	2.82

Tab. II. Incidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Chinese hospital patients in Singapore

Age group	Number studied	Enzyme activity absent	%
Birth –7 days	29	13	44.89
8 days –4 weeks	22	8	36.35
5 weeks –6 months	49	8	16.32
7 months –12 months	10	—	—
13 months–10 years	43	6	13.95
11 years –75 years	44	9	20.45
Total	197	44	22.33

Tab. III. Incidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in non-Chinese hospital patients in Singapore

Age group	Indians		Malays		Nepalese		Jews	
	[a]	[b]	[a]	[b]	[a]	[b]	[a]	[b]
Birth –7 days	3	–	4	3	–	–	–	–
8 days –4 weeks	2	1	1	–	–	–	–	
5 weeks –6 months	4	–	3	–	–	–	1	1
7 months –12 months	1	–	–	–	–		–	
13 months–10 years	6	–	5	–	1	–	1	1
11 years –75 years	1	–	10	–	2	–	1	1
Total	17	1	23	3	3	–	3	3

[a] number studied. [b] number deficient.

deficiency was found amongst European 'white', Nepalese Gurkha, Arab, Filipino and Turkish subjects and only single instances amongst Eurasians and in a Puerto Rican.

A similar study, though on a smaller number of blood samples obtained from the umbilicial cord, revealed an enzyme deficiency in only two otherwise normal Chinese infants (VELLA[11]). The absence of an association between this enzyme defect and the presence of abnormal haemoglobins or the thalassaemia abnormality in erythrocytes has been demonstrated (VELLA[12]).

During the same period, 243 blood samples from hospital patients of both sexes were also tested for enzyme deficiency. These samples were obtained from individuals suffering from severe neo-natal jaundice, severe anaemia, haemolytic jaundice or haemoglobinuria. The material studied and the results obtained are summarised in Tables II and III. Of 51 Chinese infants hospitalised during the first four weeks of life 21 (i.e. 41.18%) were enzyme deficient, and in these the diagnosis that had been made was that of 'severe unexplained neo-natal jaundice' or 'severe unexplained neo-natal jaundice with kernicterus' (SMITH and VELLA[13]).

The same enzymatic defect was found in two Italian infants suffering from kernicterus (SEGNI[14]). Of 5 Malay infants studied during the same period of life, 3 were enzyme deficient and in them the clinical diagnosis was the same as that in the Chinese infants (WEATHERALL[15]). Amongst 146 Chinese patients tested after the first week of life, 23 (i.e. 15.75%) were enzyme deficient. In at least 7 of these instances, a haemolytic episode had followed the taking of Chinese medicines or western drugs. Of the remaining 41 samples, three had come from Jewish subjects and all three were enzyme deficient. A full report on one of these Jewish subjects has been published (VELLA and PHOON[16]).

There is no doubt that, contrary to the results of BEUTLER et al.[5], deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase in erythrocytes is far from rare amongst Chinese subjects and in fact is present in a significant number of Chinese infants in whom a kernicterus syndrome develops in absence of any demonstrable maternal-foetal blood incompatibility, and in Chinese patients suffering from episodes of haemolysis. The Chinese subjects of Singapore and the Federation of Malaya emanated mainly from the southern provinces of China, while the Indians came mainly from the southern parts of India. Extensive surveys in various regions should help to elucidate the real incidence of this enzyme defect in south-east Asia.

Résumé. Chez des anémiques de sexe masculin étudiés à Singapour, l'auteur a constaté l'absence ou la déficience de l'activité de la glucose-6-phosphate déhydrogénase érythrocytaire dans les proportions suivantes: 2,5% sur 240 Chinois, 3,33% sur 132 Indiens, 37,5% sur 16 Israélites et 0,65% sur 155 Malais. L'absence de cette activité enzymatique était fréquente chez les malades chinois, malais et israélites hospitalisés pour anémie grave, ictère grave des nouveau-nés, anémie hémolytique ou hémoglobinurie.

F. VELLA[17]

Department of Biochemistry, University of Khartoum (Sudan), January 12, 1961.

[12] F. VELLA, Exper. *16*, 284 (1960).
[13] G. D. SMITH and F. VELLA, Lancet I, *1960*, 1133.
[14] G. SEGNI, Minerva Pediatrica *11*, 1420 (1959).
[15] D. J. WEATHERALL, Lancet II, *1960*, 835.
[16] F. VELLA and PHOON WAI-ON, Med. J. Malaya *13*, 309 (1959).
[17] *Acknowledgements.* The work reported here was carried out while the author was a Lecturer in the Department of Biochemistry, University of Malaya in Singapore.
I am grateful to Professor A. G. MOTULSKY and Dr. J. M. CAMPBELL of the Department of Medicine, University of Washington, Seattle (Washington), for making available to me details of their method for the rapid detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes, to Mr. S. PANG for valuable technical assistance, and to all those who have helped me in collection of the samples referred to in this report.

Quantitative Investigations on the Solubility of Proteins Extracted from Tissues Fixed by Different Chemical and Physical Methods

The development of quantitative histochemistry caused a series of investigations concerning the possible loss of particular substances from the examined tissues during histological procedure, knowledge of the extent of such losses in case of different substances, tissues and techniques is necessary to choose the best suited procedure in each instance, as well as for the critical evaluation of the results obtained.

The aim of this work was to investigate the possible losses of proteins from tissues following different methods of fixation. Only the influence of fixation was investigated, the changes caused by the remaining steps of histological procedure being omitted from our considerations.

Similar investigations were already carried out, with exception of 'freeze-substitution' technique. The results are, however, contradictory or non-comparable because of differences in histological procedure or chemical determinations of proteins and/or nucleic acids[1–17].

Material and methods. The liver and kidneys of white rats were used throughout this investigation. Immediately following the sacrifice of the animals, the fragments of tissue standardised in dimensions of 85–220 mg ± 1 mg weight were fixed by one of the following methods: 1. absolute alcohol—24 h. 2. acetone—24 h. 3. 10% formalin—24 h. 4. Carnoy's fluid—24 h. 5. freeze-substitution by butanol cooled to —40°—48 h. 6. freezing-drying in —40° —10 h. The weight of tissues was controlled to determine the degree of drying. 7. unfixed tissues were used as controls.

Each tissue sample was shaken out with 5 ml of distilled water, following chemical or physical fixation, during 2 h. The fluid was filtered and its nitrogen content was determined, using micro-Kjehldahl's method according to Parnas and Wagner[18]. The sensitivity of this method permits the determination of 0.01 mg of nitrogen.

Tab. I. Total N and protein content of water extracts of liver fixed by different methods

Method of fixation	Number of experiments	Total N		Extraprotein N		Proteins	
		Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation
Controls unfixed	10	1.02	0.18	0.06	0.04	6.04	1.36
Absolute alcohol	10	0.34	0.06	0.05	0.03	1.78	0.79
Acetone	10	0.49	0.06	0.04	0.05	2.82	0.09
10% formalin	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Carnoy's fluid	10	0.05	0.02	0.00	0.00	0.30	0.15
Freeze-substitution	10	1.15	0.17	0.07	0.03	6.78	1.23
Freezing-drying	9	1.30	0.41	0.06	0.04	8.15	2.54

Results expressed as mg of nitrogen or proteins on 100 mg fresh weight of rat liver.

Tab. II. Total N and protein content of water extracts of kidneys fixed by different methods

Method of fixation	Number of experiments	Total N		Extraprotein N		Proteins	
		Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation
Controls unfixed	10	1.11	0.27	0.13	0.03	6.14	1.86
Absolute alcohol	10	0.34	0.06	–	–	–	–
Acetone	10	0.79	0.13	–	–	–	–
10% formalin	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Carnoy's fluid	10	0.05	0.01	0.00	0.00	0.30	0.08
Freeze-substitution	10	1.22	0.32	0.13	0.03	6.86	2.19
Freezing-drying	10	1.33	0.32	0.13	0.03	7.53	2.19

Results expressed as mg of nitrogen or proteins on 100 mg fresh weight of rat kidneys.

[1] E. J. Ambrose, Progr. bioph. biol. Chem. *6*, 25 (1956).
[2] M. Berenbom and H. Yokohama, Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. *81*, 125 (1952).
[3] J. Brachet and A. Mirsky, The Cell *1*, 72 (1955).
[4] M. S. Burstone, J. Histochem. and Cytochem. *6*, 322 (1958).
[5] J. E. Edström, Biochim. biophys. Acta *12*, 361 (1953).
[6] E. Harbers and K. Neumann, Z. Naturforschg. *10b*, 377 (1955).
[7] J. Hartleib, H. Diefenbach, and W. Sandritter, Acta histochem. *2*, 196 (1956).
[8] B. D. Kaufmann, M. R. Mc Donald, H. Gay, K. Wilson, K. Wymann, and N. Okuda, Carnegie Year Book *47*, 144 (1948).
[9] S. Lagerstaedt, Exper. *12*, 425 (1956).
[10] S. Lagerstaedt, Z. Zellforschg. *45*, 472 (1957).
[11] R. W. Merriam, J. Histochem. Cytochem. *6*, 43 (1958).
[12] K. Neumann, in *Handbuch der Histochemie*, Bd. I (1958).
[13] K. Ostrowski, S. Barański, and J. Kawiak, Rozpr. VI Wydz PAN (Polish text), p. 103 (1958).
[14] W. Sandritter and J. Hartleib, Exper. *11*, 313 (1955).
[15] U. Stenram, Exp. Cell Res. *15*, 174 (1958).
[16] B. Sylven, Extrait d'Acta Union Int. contre le Cancer *7*, 700 (1951).
[17] B. Sylven, *Freezing and Drying*, Inst. of Biol. London (1951), p. 169.
[18] J. K. Parnas and R. Wagner, Biochem. Z. *125*, 253 (1921).

To determine the extra-proteic nitrogen, a similar series of experiments was carried out with the difference that the proteins were removed from the fluid by phenol (KIRBY[19]).

Results. The results obtained are presented in Table I for liver and Table II for kidneys.

The nitrogen content was determined also in the remaining fixatives, i.e. in formalin and alcohol. On the average, formalin contains 0.13 mg of N for 100 mg of liver tissue, alcohol —0.20 mg of N for 100 mg of liver tissue.

The method applied in the present work does not permit us to determine the content of DNA-nitrogen, because this remains in the phenol fraction. DNA elued does not exceed 1% of fresh tissue weight, so that authors feel their assumption that total extra-proteic nitrogen was determined to be justified.

Conclusions. 1. The quantity of proteins elued from lyophilized material and controls is equal, differences noted being statistically insignificant. 2. The method of freeze-substitution is comparable as regards protein elution to lyophilization and controls. 3. The elution of proteins following chemical fixation, i.e. in formalin and Caroy's fluid, is negligible, being lower than 1% of fresh tissue weight. The quantity of proteins elued following absolute alcohol or acetone fixation may reach 2–3% of fresh tissue weight. Best reproducible results were obtained following acetone fixation. 4. No significant differences were found to exist between liver and kidney tissue.

Résumé. Les auteurs ont examiné l'influence de la fixation sur la solubilité des protéines. Le rein et le foie de rats blancs ont été fixés dans l'éthanol absolu, la formaline et l'acétone par lyophilisation et par la méthode de «freeze-substitution». Les protéines furent extraites par l'eau distillée et leur quantité déterminée par la microméthode de KJELDAHL. Un tableau résume les résultats obtenus.

K. OSTROWSKI, J. KOMENDER, and K. KWARECKI

Department of Histology and Embryology, Medical Academy, Warsaw (Poland), October 26, 1960.

[19] K. S. KIRBY, Biochem. J. *64*, 405 (1956).

Histochemical Analysis of Three Dehydrogenase Systems in the Renal Adenocarcinoma of the Frog *Rana pipiens*

Recently we studied three dehydrogenase systems in the renal adenocarcinoma of the oviparous Toothcarp *Aplocheilus lineatus*[1]. To establish whether a more general significance should be attached to the results obtained, it seemed desirable to us to perform a corresponding investigation with another lower vertebrates. As experimental material, we chose the renal adenocarcinoma in the frog *Rana pipiens*[2], of which 18 males and 26 females were available. Histologically, the tumours, involving one or both kidneys, consisted of atypical cells usually much larger and basophilic than normal kidney cells and of a scanty, poorly vascular stroma. The epithelial tumour cells which can form irregular acinar or tubular structures, sometimes show intranuclear inclusions because the chromatin is condensed about the periphery of the nucleus and is separated from the large central acidophilic inclusion by a clean space. No capsule is present and, even in very small tumours, marginal extensions of tumour tissue infiltrate the surrounding tissues. Mitoses are frequently found. Metastasis is not uncommon, especially in the lungs and liver.

This tumour was studied histochemically for the three dehydrogenase systems, namely succinic diphosphopyridine nucleotide (DPN) and triphosphopyridine nucleotide (TPN) diaphorases and the DPN-dependent enzymes: lactic, malic, glutamic, β-hydroxybutyric, and ethanolic dehydrogenases[1,3–6]. To demonstrate mitochondria some sections were also processed with Regaud's stain[7]. In general, for morphological orientation, parallel sections were stained with haematoxylin and eosin or thionin.

As in *Aplocheilus lineatus*[1], also in the tumour tissue of *Rana pipiens* the succinic dehydrogenase activity was low as compared to normal tissues. This enzyme appeared to be linked to the mitochondria and cell membranes. Tumour cells undergoing necrotic changes were inactive or very nearly so, but the intraluminal material revealed a marked enzymatic activity, which was due either to persistent organelles of disintegrating desquamated tumour cells or, which is less likely, to the presence of the enzyme system in the tumour cell secretion.

The DPN diaphorase activity was high, however, similar to that in the most intensely stained normal cells. The DPN diaphorase and the DPN-linked dehydrogenases appeared to be linked to the mitochondria and some cell membranes. The TPN diaphorase activity was observed to be much lower than the DPN diaphorase activity showing a more finely and widely dispersed intracytoplasmic distribution, which is suggestive of the presence of microsomes, and displayed a high concentration in the cell membranes. The glutamic and particularly the ethanolic dehydrogenase activities were only weak in the tumour

Distribution of succinic dehydrogenase, DPN and TPN diaphorases and several DPN-linked dehydrogenases in the renal adenocarcinoma of the frog *Rana pipiens*. The enzymatic activity was rated histologically on the basis of colour reaction as 0 to 4 by inspection of the tumour cells.

Succinic dehydrogenase	1
DPN diaphorase	4
TPN diaphorase	2
Lactic dehydrogenase[a]	4
Malic dehydrogenase[a]	2
Glutamic dehydrogenase[a]	1
β-hydrobutyric dehydrogenase[a]	2
Ethanolic dehydrogenase[a]	0

[a] DPN-linked dehydrogenases

[1] A. STOLK, Naturwiss. *47*, 188 (1960); Proc. Kon. Ned. Akad. Wet., Amsterdam *63*, 548, 567 (1960).
[2] B. LUCKÉ, Amer. J. Cancer *20*, 352 (1934); *22*, 326 (1934); *34*, 15 (1938); J. exp. Med. *68*, 457 (1938); *70*, 269 (1939); *70*, 257 (1939); *72*, 311 (1940); *72*, 321 (1940); *89*, 269 (1949).—H. G. SCHLUMBERGER and B. LUCKÉ, Cancer Res. *8*, 657 (1948).
[3] A. M. SELIGMAN and A. M. RUTENBURG, Science *113*, 317 (1951).
[4] K. C. TSOU, C. S. CHENG, M. M. NACHLAS, and A. M. SELIGMAN, J. Amer. chem. Soc. *78*, 6139 (1956).
[5] M. M. NACHLAS et al., J. Histochem. *5*, 420 (1957); J. Biophys. Biochem. Cytol. *4*, 467, pl. 223 (1958); 29, pl. 11 (1958).
[6] B. MONIS, M. M. NACHLAS, and A. M. SELIGMAN, Cancer *12*, 1238 (1959).
[7] R. D. LILLIE, *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*, 2nd Ed. (The Blakiston Company, Inc., New York 1954), p. 185.

tissue, while the lactic, malic and β-hydroxybutyric dehydrogenase activities were quite high. The neoplastic tissue appeared to be poorer in ethanolic dehydrogenase than most of the normal tissues. The lactic dehydrogenase was more active than the malic dehydrogenase. As these results, which are given in the Table, generally correspond very well with those obtained with some human tumours[6] and the renal adenocarcinoma of *Aplocheilus lineatus*[1], they must undoubtedly be regarded to be of more general significance.

Zusammenfassung. Drei Dehydrogenase-Systeme (Succinodehydrogenase, DPN- und TPN-Dehydrogenase sowie einige DPN-Dehydrogenase-ähnliche Dehydrogenasen wie die auf Milchsäure, Malonsäure, Glutaminsäure, β-Hydroxybuttersäure sowie Äthanol wirkenden substratspezifischen Dehydrogenasen) wurden am Adenocarcinom der Froschniere einer histochemischen Analyse unterzogen.

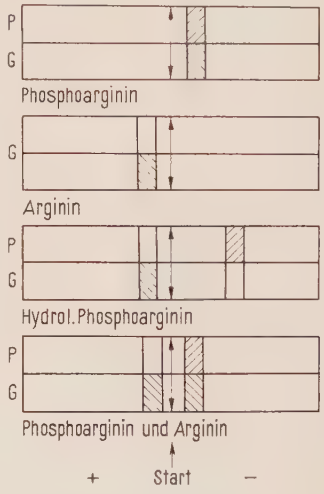
Die Enzymaktivität war für die DPN- und die Milchsäure-Dehydrogenase sehr hoch; eine mittlere Aktivität zeigten die TPN-, die Malonsäure- und die β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase. Sehr gering war die Reaktion für die Succino- sowie die Glutaminsäure-Dehydrogenase, während sie für die Äthanol-Dehydrogenase negativ ausfiel.

A. Stolk

Department of Histology, Free University, Amsterdam (The Netherlands), December 2, 1960.

Die papierelektrophoretische Auftrennung von Phosphoarginin und Arginin

Zur rascheren und deutlicheren Auftrennung phosphorhaltiger Guanidinderivate wurde vergleichend zur papierchromatographischen[1] die papierelektrophoretische Auftrennung angewandt. Untersucht wurden saures[2], aus Hummern isoliertes Phosphoarginin[3], basisches Arginin[4], sowie hydrolysiertes Phosphoarginin[5] (pH 1,0, 100°C, 1 min). Die papierelektrophoretische Auftrennung war schon nach 1 h bei einer Stromstärke von 0,5 mA/cm (Veronalpuffer: pH 8,6; u 0,1) bei 20°C möglich. Nach Trocknung der Streifen (105°C, 15 min) wurden zur Darstellung der monosubstituierten Guanidine Sakaguchis Reagens[6] und zu der der Phosphorsäure Molybdänsäure[7] als Entwickler verwendet. In der Figur werden die Ergebnisse für Streifen mit Phosphoarginin, Arginin, hydrolisiertem Phosphoarginin, sowie für ein Gemisch aus Phosphoarginin und Arginin wiedergegeben.



Papierelektrophoretische Auftrennung von Phosphoarginin und dessen Komponente bei pH = 8,6. G = Guanidin-Reagens; P = Phosphorsäure-Reagens

Summary. A paper electrophoretic separation method for phosphoarginin and arginin is described.

W. Thorsell und E. Lienert

Chemisches Institut, Tierärztliche Hochschule, Stockholm (Schweden), und Pharmakologisches Institut, Tierärztliche Hochschule, Wien (Österreich), 5. Dezember 1960.

[1] G. E. Hobson und K. R. Rees, Biochem. J. *61*, 549 (1955).
[2] A. H. Ennor, J. F. Morrison und H. Rosenberg, Biochem. J. *62*, 358 (1956).
[3] A. H. Ennor und J. F. Morrison, Physiol. Rev. *38*, 638 (1958).
[4] *The Merck Index of Chemicals and Drugs*, 7th Ed. (1960), p. 98.
[5] LKB-Produkte: Paper Electrophoresis Equipment (1959).
[6] R. Acher und C. Crocker, Biochem. biophys. Acta *9*, 704 (1952).
[7] S. Burrows, F. S. M. Grylls und J. S. Harrison, Nature *170*, 800 (1952).

Elektroretinogramm und Netzhautstruktur der Sumpfohreule (*Asio flammeus*)

Aus vergleichenden Untersuchungen ist bekannt, dass die Netzhäute ausgesprochener Tages- bzw. Dämmerungstiere strukturelle und funktionelle Besonderheiten aufweisen, welche die Unterscheidung eines photopischen bzw. skotopischen Systems ermöglichen. Im Anschluss an eine bei Säugern (Ziesel und Meerschweinchen) durchgeführte Studie[1] wurde nunmehr mit gleicher Methodik das ERG eines typischen Nachtvogels (*Asio flammeus flammeus*) untersucht und mit dem bereits bekannten ERG eines Tagvogels (Taube)[2] verglichen. Die Struktur der untersuchten Netzhäute wurde histologisch kontrolliert.

Die Tiere (1 Sumpfohreule, 3 Tauben) befanden sich in Urethannarkose (1,5–2,0 g/kg) und waren sorgfältig vor Auskühlung geschützt. Die Lichtreize (Einzel-, Doppel- und Flimmerlichtblitze) wurden mit einem elektronischen Lichtstimulator (Grass PS-1) erzeugt. Die in lux angegebenen Reizintensitäten (weisses Licht, Xenon-Gasentladungslampe) beziehen sich auf die Beleuchtungsstärke in der Eintrittspupille (Reizfeld: 13 cm ∅, 30 cm vor dem Auge; Reizdauer etwa 10 μsec). Die Registrierung des ERG erfolgte mittels Pt-Cornealelektrode, RC-Verstärker (Zeitkonstante 0,3 sec), Kathodenstrahloszillographen und Camera. Zur histologischen Untersuchung wurden die Tiere mit Zenkerscher Lösung vitalfixiert und die hinteren Bulbusschalen in Paraffin oder nach der heissen Celloidin-Methode eingebettet.

Das Einzelblitz-ERG der Eule unterscheidet sich von jenem der Taube durch eine niedrigere Schwelle sowie vor allem durch einen wesentlich langsameren Verlauf

[1] H. Bornschein und Gy. Szegvári, Z. Biol. *110*, 285 (1958).
[2] E. Dodt und A. Wirth, Acta physiol. scand. *30*, 80 (1953).

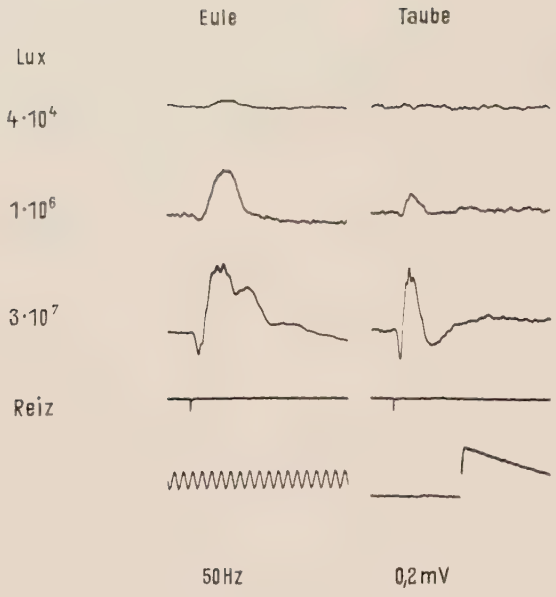


Fig. 1. Einzelblitz-ERG von Sumpfohreule und Taube bei 3 verschiedenen Reizintensitäten (Blitzdauer etwa 10 μsec).

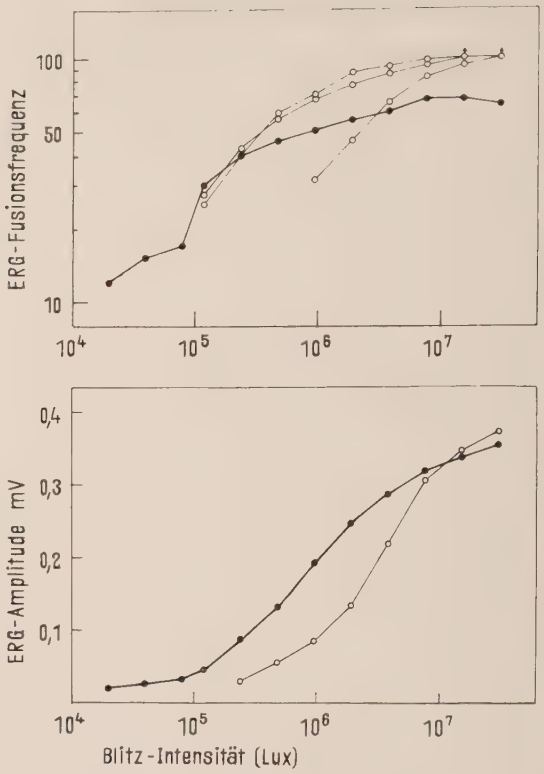


Fig. 2. Fusionsfrequenz des Flimmer-ERG (Blitze/sec, oben) und Amplitude des Einzel-ERG (mV, unten) in Abhängigkeit von der Reizintensität (Blitzdauer etwa 10 μsec). Sumpfohreule (●) und Taube (○).

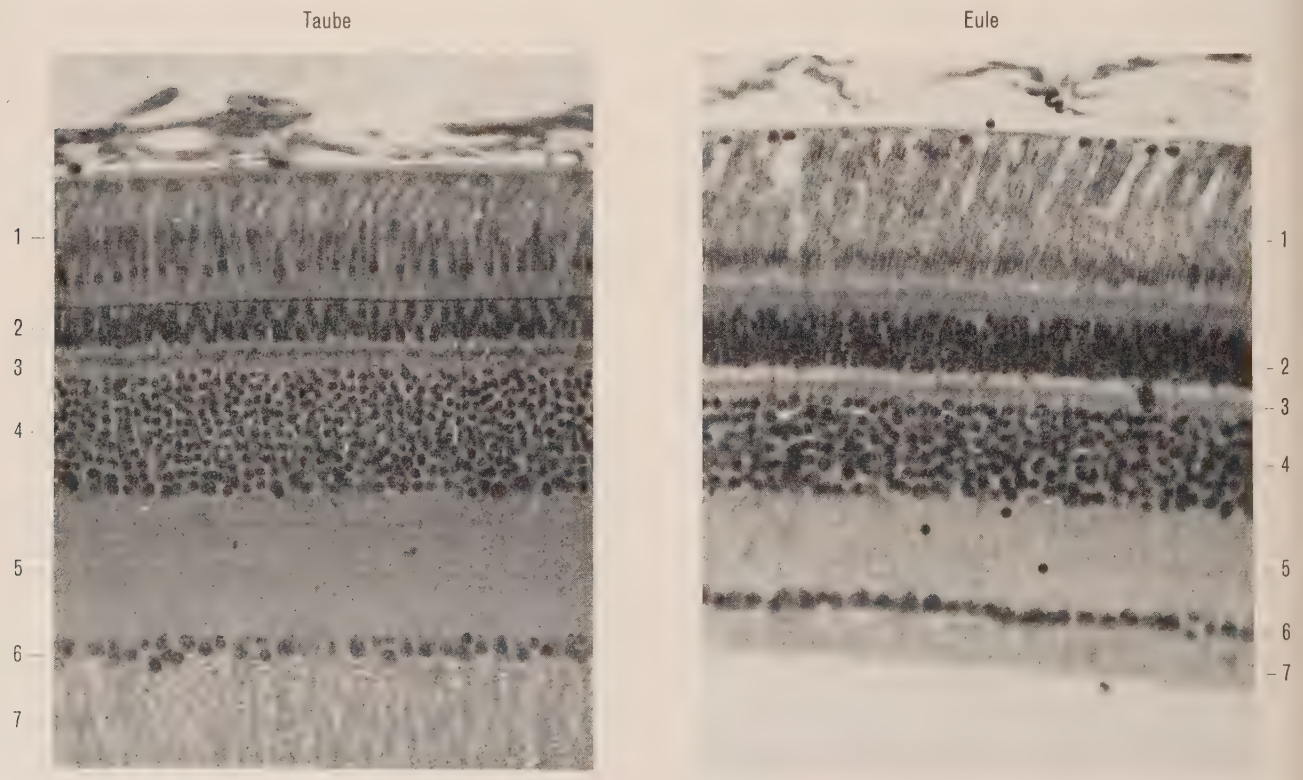


Fig. 3. Vergleich der Netzhäute von Taube und Sumpfohreule. Vitalfixation mit Zenker. Eisenhämatoxilin-Anilinblau. ×467. 1 Sehzellen; 2 äussere Körnerschicht; 3 äussere plexiforme Schicht; 4 innere Körnerschicht; 5 innere plexiforme Schicht; 6 Ganglienzellschicht; 7 Opticusfaserschicht.

(Fig. 1). In beiden Fällen besteht das durch Lichtblitze hoher Intensität ausgelöste ERG aus negativer a-Welle und positiver b-Welle, wobei der letzteren kleine Wellen überlagert sind, deren Frequenz 80–120/sec beträgt. Ein bei der Eule im abfallenden Schenkel der b-Welle beobachteter positiver Buckel ist insoferne schwierig zu deuten, als ein Irispotential nicht ausgeschlossen werden kann. Die graphische Beziehung zwischen Reizintensität und Gesamtamplitude des Einzel-ERG stellt eine stetige Kurve dar, deren Verlauf bei der Eule weniger steil ist als bei der Taube (Fig. 2, unten). Die Doppelblitzversuche ergaben bei 150 msec Intervall stets zwei getrennte Antworten, deren Amplitudenverhältnis A_{II}/A_I mit steigender Reizintensität bei der Eule auf etwa 0,2 absank, bei der Taube hingegen auf 0,8–0,9 blieb. Mit einem Reizintervall von 60 msec war nur mehr bei der Taube ($A_{II}/A_I = 0{,}25$), mit 30 msec bei keiner der beiden Tierarten eine messbare zweite Reizantwort zu erzielen. Entsprechende Ergebnisse lieferte die Bestimmung der ERG-Flimmerverschmelzungsfrequenz als Funktion der Reizintensität (Fig. 2, oben). Der Maximalwert der Eule lag mit 65–70/sec überraschend hoch, erreichte jedoch die Werte der Taube nicht, die in Übereinstimmung mit früheren Befunden[2] über 100/sec stiegen. Die Ergebnisse zeigten somit, dass das ERG der Eule gegenüber dem ERG der Taube bestimmte quantitative Unterschiede aufweist, welche vor allem das zeitliche Auflösungsvermögen betreffen, aber bei weitem nicht so ausgeprägt sind wie bei vergleichend untersuchten Säugern[1,2].

Die Netzhäute beider Arten enthalten Stäbchen und Zapfen, wenn auch insofern in verschiedenem Verhältnis, als bei der Eule die Stäbchen, bei der Taube hingegen die Zapfen zahlenmässig überwiegen. Obwohl die *Fovea* infolge ihres geringen Flächenanteils für das ERG unwesentlich ist, sei der Vollständigkeit halber erwähnt, dass die Taube eine flache zentrale *Fovea* (stäbchenfrei) und die Eule eine besser ausgeprägte temporale *Fovea* (mit Zapfen und Stäbchen) besitzt. Die Eulenretina erwies sich in keinem Abschnitt als stäbchen- oder zapfenfrei. Sie enthält pro Flächeneinheit eine grössere Anzahl von Sehzellen sowie weniger Zellen der inneren Körner- und Ganglienzellschicht als die entsprechenden Abschnitte der Taubenretina (Fig. 3), wenn auch die Unterschiede zwischen Eulen- und Taubenretina keineswegs so gross sind wie bei den Netzhäuten verschiedener Säuger[3]. Offen bleibt die Frage, ob das Überwiegen eines bestimmten Rezeptortyps oder der Grad der Konvergenz bzw. die Ausbildung der inneren Netzhautschichten für das unterschiedliche Verhalten des ERG verantwortlich zu machen ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Retina der Sumpfohreule keineswegs als typisches skotopisches System gelten kann. Diese Schlussfolgerung steht mit älteren histologischen Befunden bei verschiedenen Eulenarten[4] sowie mit vereinzelten Angaben über eine gute Tagessehschärfe der Eulen[5] in Einklang.

Summary. Single flash and flicker electroretinograms were recorded for a nocturnal owl and the results discussed in terms of its retinal structure. The differences both in electrical response and in retinal structure between the owl and the pigeon were less than those found between nocturnal and diurnal mammals.

H. Bornschein und Katharine Tansley

Physiologisches Institut der Universität Wien und Institute of Ophthalmology, London, 20. Oktober 1960.

[3] G. B. Arden und K. Tansley, J. Physiol. *127*, 592 (1955); *130*, 225 (1955).

[4] S. Garten, in Graefe-Saemisch, *Handbuch der gesamten Augenheilkunde 3/12* (Anh.), p. 33 (1908); W. Kolmer, in W. v. Möllendorf, *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen 3/2*, p. 295 (1936).

[5] G. L. Walls, *The Vertebrate Eye* (Cranbrook, Bloomfield Hills 1942).

Freisetzung von Brenzcatechinaminen aus der isoliert durchströmten Nebenniere durch Tyramin und β-Phenyläthylamin

Die «indirekt» wirkenden Sympathicomimetica, zu denen auch Tyramin und β-Phenyläthylamin gehören, sollen nach den Untersuchungen von Burn und Rand[1] sowie von Holtz, Osswald und Stock[2] im wesentlichen dadurch ihre sympathicomimetischen Wirkungen ausüben, dass sie Noradrenalin bzw. Adrenalin freisetzen. – In eigenen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass Tyramin und β-Phenyläthylamin tatsächlich in der Lage sind, aus isolierten chromaffinen Granula, den Speicherorganellen für Noradrenalin und Adrenalin in den sympathischen Nerven und den Nebennierenmarkzellen, die gespeicherten Sympathicomimetica freizusetzen (Schümann[3], Schümann und Weigmann[4]). – Der durch Tyramin verursachten Freisetzung von Brenzcatechinaminen liegt nach unseren Untersuchungen an isolierten Nebennierenmarkgranula vom Rind ein Verdrängungsmechanismus zugrunde, da der abgegebenen Menge an Brenzcatechinaminen eine im stöchiometrischen Verhältnis erfolgende Aufnahme von Tyramin durch die Granula entspricht (Schümann und Philippu[5]).

In Versuchen *in vivo* konnte Strömblad[6] vor kurzem zeigen, dass der Noradrenalingehalt der *Glandula submaxillaris* von Katzen nach einer ca. 1stündigen Tyramininfusion etwa auf die Hälfte des Ausgangsgehaltes absinkt, das heisst, dass Tyramin auch *in vivo* eine Freisetzung von Noradrenalin verursacht. Demgegenüber vermochte derselbe Autor[7] an der isoliert durchströmten Katzennebenniere keine Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin durch Tyramin nachzuweisen.

Die Tatsache, dass Tyramin in unseren Versuchen aus isolierten Nebennierenmarkgranula Brenzcatechinamine freisetzt, in den Versuchen Strömblads jedoch aus intakten Nebennierenmarkzellen offenbar nicht, hat uns veranlasst, die Wirkung von Tyramin und β-Phenyläthylamin an der isoliert durchströmten Nebenniere zu untersuchen.

Methoden. Frische vom Schlachthof erhaltene Rindernebennieren wurden in Anlehnung an die von Hechter, Jacobsen, Schenker, Levy, Jeanloz, Marshall und

[1] J. H. Burn und M. J. Rand, J. Physiol. *144*, 314 (1958).

[2] P. Holtz, W. Osswald und K. Stock, Arch. exp. Path. Pharmak. *239*, 14 (1960).

[3] H. J. Schümann, Arch. exp. Path. Pharmak. *238*, 41 (1960).

[4] H. J. Schümann und E. Weigmann, Arch. exp. Path. Pharmak. *240*, 275 (1960).

[5] H. J. Schümann und A. Philippu, Arch. exp. Path. Pharmak., im Druck (1961).

[6] B. C. R. Strömblad, Exper. *16*, 417 (1960).

[7] B. C. R. Strömblad, Brit. J. Pharmacol. *15*, 328 (1960).

PINCUS[8] angegebene Methode mit Tyrodelösung, die vorher mit Carbogen (95% O_2 + 5% CO_2) gesättigt worden war, bei 37°C von einer der grossen Nebennierenvenen aus retrograd mit einem Druck von 55–60 cm Wasser durchströmt. Das Perfusat wurde jeweils 3 min lang in $HClO_4$-haltigen Messzylindern gesammelt (0,34 ml konz. $HClO_4$/10 ml Perfusat). Nach Zugabe von 20%iger K_2CO_3-Lösung bis pH 6,0 wurde vom ausgefallenen $KClO_4$ abzentrifugiert und die Brenzcatechinamine (Adrenalin + Noradrenalin) colorimetrisch nach v. EULER und HAMBERG[9] bestimmt. Tyramin und β-Phenyläthylamin, die ohne Einfluss auf die Bestimmung der Brenzcatechinamine sind, wurden – in 0,4 ml Tyrode gelöst – kurz oberhalb der in die Vene eingebundenen Kanüle in 6 sec injiziert.

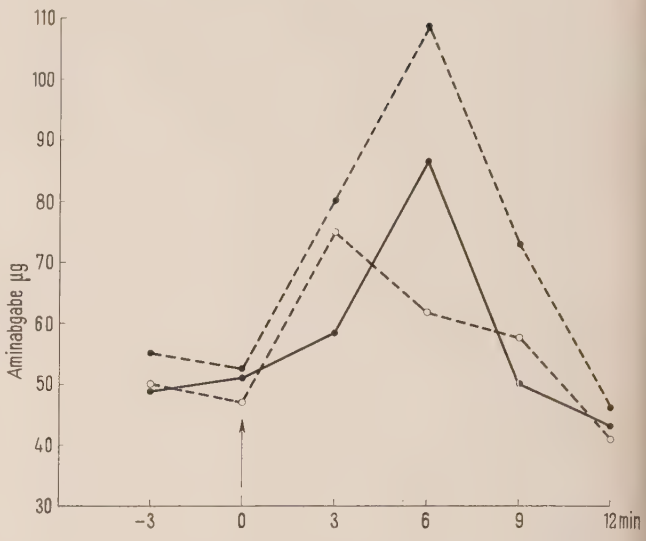
Versuche. Bei der Durchströmung der Nebenniere mit Tyrodelösung kommt es schon spontan zu einer Abgabe von Brenzcatechinaminen (Fig.). Sie beträgt je nach Grösse der Nebennieren etwa 40 bis 60 μg in der 3min-Periode. Nebennieren mit stark schwankender Spontanfreisetzung wurden verworfen. Die Injektion von Tyramin oder β-Phenyläthylamin führt zu einer dosisabhängigen Steigerung der Brenzcatechinaminabgabe. Diese hält etwa 9 min an. Die höchsten Sekretionswerte findet man meistens 6 min, in manchen Fällen schon 3 min nach der Injektion, wie aus dem Verlauf der in der Figur wiedergegebenen Versuche an 3 verschiedenen Nebennieren hervorgeht. Tyramin ist ebenso wie in unseren früheren Versuchen an isolierten chromaffinen Granula deutlich schwächer wirksam als β-Phenyläthylamin.

In der Tabelle ist die durch Tyramin und β-Phenyläthylamin verursachte Sekretionssteigerung unter Zugrundelegen der Sekretionshöchstwerte in Prozent der Spontansekretion angegeben. Auch aus dieser tabellarischen Zusammenstellung ist zu ersehen, dass β-Phenyläthylamin wirksamer ist als Tyramin, nämlich ungefähr 4mal. Acetylcholin ist etwa 1000mal wirksamer als die Amine.

Summary. 1. When fresh cattle adrenals are perfused *in vitro* with Tyrode's solution at 37°C, a spontaneous release of catechol amines takes place. This release is enhanced by the injection of tyramine or β-phenylethylamine. 2. In agreement with earlier observations on isolated medullary granules, β-phenylethylamine is more active than tyramine: 16 μ*M* of β-phenylethylamine, 66 μ*M* of tyramine, and 0.03 μ*M* of acetylcholine release almost equal amounts of catechol amines.

H. W. HAAG, A. PHILIPPU[10] und H. J. SCHÜMANN[11]

Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt am Main (Deutschland), 3. Februar 1961.



Freisetzung von Brenzcatechinaminen aus isoliert durchströmten Rinder-Nebennieren
→ = Injektion von Tyramin bzw. β-Phenyläthylamin. ●—● Tyramin 66,0 μ*M*. o---o β-Phenyläthylamin 16,5 μ*M*. ●---● β-Phenyläthylamin 33,0 μ*M*.

Prozentuale Steigerung der Brenzcatechinaminabgabe aus der isoliert durchströmten Rindernebenniere durch Tyramin und β-Phenyläthylamin

Zahl der Versuche	Injektion von		Sekretionssteigerung in % der Spontansekretion[a]
	μ*M*	Substanz	
7	33,0	Tyramin	29,4 ± 5,91
7	66,0	Tyramin	66,7 ± 4,35
10	16.5	β-Phenyläthylamin	64,2 ± 6,95
6	33,0	β-Phenyläthylamin	124,5 ± 8,88
9	0,03	Acetylcholin	73,8 ± 2,95

[a] Die Zahlen bedeuten Mittelwerte und deren mittlere Fehler.

[8] O. HECHTER, R. P. JACOBSEN, V. SCHENKER, H. LEVY, R. W. JEANLOZ, C. W. MARSHALL und G. PINCUS, Endocrinol. *52*, 679 (1953).

[9] U. S. v. EULER und U. HAMBERG, Acta physiol. scand. *19*, 74 (1949).

[10] Forschungs-Stipendiat der Alexander von Humboldt-Stiftung.

[11] Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Rassenspezifisches Verhalten gegen einen Raubfeind[1]

Unser Trauerschnäpper (*Ficedula hypoleuca hypoleuca* Pallas) «hasst» auf den ruhenden Rotrückenwürger (*Lanius collurio*), indem er gereihte Alarm- und Schmatzlaute ausstösst. Ein solcher Alarm (= «Hassen») lässt sich sinnvoll quantifizieren, indem man von seinem Beginn 3 min lang Alarm- und Schmatzlaute mitzählt und daraus den Mittelwert für eine Reaktionsminute berechnet. Ein Modell des Würger-♂, nahe der Bruthöhle aufgestellt, muss mindestens würgergross sein, aufrecht sitzen und einen schwarzen Augenstreif haben, um einen Alarm auszulösen. Das ergaben 430 Freiland-Attrappenversuche[2]. – Die Kenntnis des Rotrückenwürgers reift höchstwahrscheinlich unabhängig von jeglicher Erfahrung mit ihm, weil a) über 90% der gesamten Schnäpperpopulation auf ihn hassen, und b) einjährige und mehrjährige Brutvögel sich in der Antwortstärke nicht unterscheiden. Wie Kaspar-

[1] Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

[2] E. CURIO, *Untersuchungen über das Feindverhalten des Trauerschnäppers*, in Vorbereitung.

Das Hassen beider Trauerschnäpperrassen auf den Rotrückenwürger A; das Hassen der spanischen Rasse auf den Waldkauz B. M = Mittel, σ = Standardabweichung, D = Mittelwertsdifferenz, P = Überschreitungswahrscheinlichkeit

Rasse	Ort	Reaktionsstärke (Rufe/min)				D	P%
		M	$\pm \sigma$	*n* Indiv.	Extreme		
A *hypoleuca*	Berlin	65,3	38,6	130	0–163	54,9	$\leqslant$ 0,02
iberiae	La Granja	10,4	18,8	35	0–112,3		
B *iberiae*	La Granja	(7,4	11,3	34	0– 23[a]	30,4	0,25
		40,8	43,7	12	0–125,3		

[a] Ohne ein «Aussenseiter»-♀ mit 112,3 R/min

Hauser-Aufzuchten zeigten, ist obendrein die Motorik des Hassens, nämlich Rufe und hochdifferenzierte Alarmbewegungen (Flügelzucken und andere) voll angeboren[3].

Für die in den spanischen Mittelgebirgen lebende Rasse *Ficedula hypoleuca iberiae* (Witherby 1928) bedeutet der Rotrückenwürger keinen Feind, weil er südlich der Pyrenäen und der Kantabrischen Gebirge in Spanien fehlt. Um zu prüfen, wie der spanische Trauerschnäpper auf den Würger reagiert, bot ich Brutvögeln in La Granja (Sierra Guadarrama), 85 km nördlich von Madrid (1200 m ü. M.), denselben Rotrückenwürger-♂-Balg wie den Vögeln in Berlin; mit ihm hatte ich dort die stärksten Antworten erzielt, die sich von denen auf den lebenden Würger nicht unterscheiden. – Die Reaktionsstärke ist unabhängig vom Geschlecht des geprüften Brutvogels.

In dem ehemals königlichen Park von La Granja lebten im Frühjahr 1960 etwa 30 Brutpaare und 20 unverpaarte ♂♂. Der alte Baumbestand bot reichliche Nistgelegenheiten, die ich ergänzte, indem ich 10 Holzbetonhöhlen der Firma Schwegler (Haubersbronn) aufhängte, von denen Ende Mai 6 bezogen waren. Dadurch liessen sich zusätzlich mehrere Paare mit Jungen prüfen (siehe unten).

Insgesamt bot ich 35 Brutvögeln den Standardbalg des Würger-♂ dar und buchte ihre Antworten. Sie hassten signifikant schwächer als die Berliner Trauerschnäpper, nämlich nur etwa ein Sechstel so stark (Tab. Ia, strenges t-Verfahren[4]), oder so viel wie diese auf ein Gipsmodell des harmlosen Steinschmätzer-♂ (*Oenanthe oenanthe*). Sieht man von einem stark alarmrufenden *iberiae*-♀ ab, dessen spezielle Problematik hier nicht diskutiert sei, so fällt der Unterschied zwischen beiden Rassen noch grösser aus. Die meisten der Schnäpper in La Granja sangen nach wenigen Alarmrufen weiter, ♀♀ schlüpften neben dem Würger-♂ in die Höhle zum Brüten oder beide Partner zum Füttern. Berliner Vögel hingegen wagen so lange nicht aufs Nest zu gehen, bis der Feind verschwunden ist.

Berliner *hypoleuca*-Paare mit Jungen hassen eindeutig um 25% stärker als die mit Nest oder Eiern. Um das obige Ergebnis von der geringen Alarmbereitschaft der Spanier zu erschüttern, wies ich möglichst vielen, nämlich 16 fütternden Altvögeln zusätzlich den Würger-Balg vor. Zwar steigt die Antwortbereitschaft auch hier nach dem Jungenschlupf, doch nicht signifikant: 30 Individuen ohne Jungen riefen 8,6 $\pm$ 20,1 Rufe/min, 16 fütternde (von denen 11 ein zweites Mal getestet waren) gaben 18,1 $\pm$ 19,2 Rufe/min (P = 12,5%).

Um zu prüfen, ob die mangelnde Alarmbereitschaft von *iberiae* spezifisch im Hassen auf den Rotrückenwürger liegt, oder ob die Fähigkeit, überhaupt einen Alarm zu geben, vermindert ist, stellte ich Kontrollversuche mit einem Balg vom Waldkauz (*Strix aluco*) an, auf den *hypoleuca* ähnlich wie auf den Würger hasst[3]. Auf ihn antworteten 12 Vögel (deren 6 zweimal geprüft wurden), die schon mit dem Würger-Balg getestet waren, mehr als 4mal so stark wie auf diesen; der Unterschied ist real (Tab. Ib). Ein fütterndes Paar hasste auf den lebenden Waldkauz sogar mit je etwa 130 Rufen/min und andere Brutvögel riefen ähnlich stark Alarm, ohne dass man immer die Ursache erkennen konnte. Demnach gründet sich das Versagen von *iberiae* spezifisch auf einen Mangel in der Afferenz; dass *iberiae* auf den Kauz nicht genau so stark hasst wie *hypoleuca* auf den Würger (Tab. Ia–b), braucht nicht zu heissen, dass sie es motorisch nicht könnte, da man die Reaktion von *hypoleuca* auf den Kauz quantitativ nicht kennt.

Rotkopf- und Raubwürger (*Lanius senator*, *L. excubitor*) leben beide in Spanien und teilen mit dem Rotrückenwürger gewisse Reize, nämlich Grösse und Haltung ungefähr und dieser obendrein den schwarzen Augenstreif. Wie eine Rundreise durch die Sierra Gredos mit zwei weiteren *iberiae*-Vorkommen, die Montes de Toledo und die Sierra Morena zeigte, sind aber spanischer Trauerschnäpper und diese Würger ökologisch völlig voneinander getrennt. Demnach dürfte die subspezifische Ausbildung eines Würger-AAM[5] bei *hypoleuca* erst unter dem Selektionsdruck eines sympatrischen und teilweise synökischen Nebeneinanderlebens mit *Lanius collurio* entstanden sein. Die andere Denkmöglichkeit, *iberiae* habe im Rotrückenwürger-freien Raum Spaniens den Würger-AAM verloren, hat aus mehreren, hier nicht zu erörternden Gründen weniger für sich. Ausser diesem abweichenden Feindverhalten kennzeichnen den spanischen Trauerschnäpper noch mindestens ein Dutzend andere Verhaltensunterschiede zu *hypoleuca* (unveröffentlicht).

Summary. German Pied Flycatchers (*Ficedula hypoleuca hypoleuca*) show a mobbing response to the Redbacked Shrike (*Lanius collurio*) as well as to owls. Spanish Pied Flycatchers (*Ficedula hypoleuca iberiae*) mob only at the latter. This correlates well with the fact that only nominate *hypoleuca* occurs together with the shrike, but both subspecies share their habitats with owls.

E. Curio

Max Planck-Institut für Verhaltensphysiologie, Seewiesen über Starnberg (Obb., Deutschland), 11. Januar 1961.

[3] E. Curio, Z. Tierpsychol. Beiheft 3 (1959).

[4] K. Pätau, Biol. Zbl. *63*, 152 (1943).

[5] Mit AAM (= angeborener Auslösemechanismus) bezeichnet man eine zentralnervöse Instanz, die auf spezifische Schlüsselreize einer biologisch bedeutsamen Situation anspricht, indem sie das zu ihr passende Verhalten in Gang setzt.

PRO EXPERIMENTIS

Growth of Hemolytic Streptococci in Vitamin Free Medium[1]

Streptococcus pyogenes bypasses its eight special nutritional essentials by conversion to the L form in vitamin free medium. This paradoxical growth has several interesting aspects. By analogy, one can speculate that organisms with nutritional complexities almost precluding their culture may be expected to grow rapidly in the L cycle. In this respect it is pertinent that *Mycobacterium tuberculosis* develops in 24 h in the L form[2]. Admittedly, specific identification of such growth may be difficult. However, if the organism is anticipated, identification may be made with appropriate antiserum, perhaps with fluorescent labeling.

Culture of fastidious bacteria on neutralite free medium also increases the scope of bacterial physiology. Growth requirements must be determined for both the classical stage and its L form. Fortunately, requirements for L form development are similar for widely different genera. Thus, a medium originally devised for the L form of *Proteus* sp.[3] will also support the L form of other *Enterobacteriaceae*[4], of *Staphylococcus aureus*[5], *Mycobacterium* sp.[2], and *Candida* sp.[6]. This defined medium is the subject of this paper.

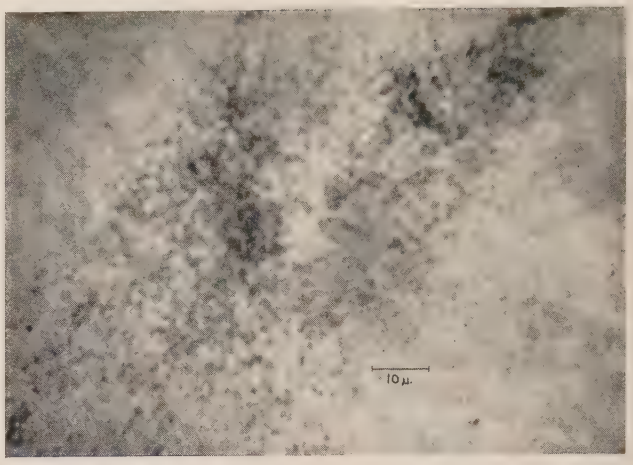
The medium is a modification of one described by MEDILL and O'KANE[3]. It consists of 0.1% dextrose, 10.0% sucrose, 0.8% Noble's agar (Difco), 2.0% sodium lactate, 0.9% K_2HPO_4, 0.2% salts, 0.5% vitamin free casamino acids. The salt mixture contains: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 40 g; NaCl 2 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 8 g. The salts were homogenized by trituration. Double strength agar was autoclaved separately. All other ingredients were mixed, put in solution in double strength and filter sterilized.

This defined medium can be obtained commercially, packed as a sterile solution which requires only the addition of freshly autoclaved double strength agar and sucrose.

Streptococci grew in the L form in the defined medium without bacteriostatic agents. The ability to form L colonies in this medium appeared characteristic of streptococci in general, since none of the seven strains were refractory. The L form seems as natural as the classical stage and will develop even with simple nutrition, if toxic agar and other ingredients which inhibit the L form are avoided.

Six of the streptococcal strains belonged to Group A; one was *Streptococcus faecalis*. To prepare the inoculum organisms from an 18 h culture in tryptose phosphate broth were washed three times and diluted in saline before standardized numbers were cut into the surface of the soft agar plates.

The morphology of the L growth is shown in the accompanying micrograph. The elements of a colony break apart with slight disturbance, necessitating that photographs of colonies be made *in situ*. The areas which are in focus show the multiple branching which was similar for all the strains of streptococci. Repeated examinations of colonies in thin preparations revealed no classical streptococcal forms. The ease with which segments of L growth separate suggests that the substances responsible for coccal alignment in streptococci and the cell wall itself are deficient in the variant. The colonial growth was consistently about 0.5 mm subsurface despite anaerobic incubation of the cultures. Thus it appears that lowered oxygen tension is critical. Microscopic L forms were



Filamentous branching growth of the L stage of β-hemolytic Streptococci

present after 24 h incubation at 37°C; macroscopic cloudiness along the line of streak was visible after further incubation.

This micrograph is remarkably similar to one of streptococcal L forms by PANOS and BARKULIS[7] except for absence of large bodies which typically result from high concentrations of penicillin. Previous studies on this genus have usually employed penicillin in a concentration of 1000 units/ml or more, following the original observation of DIENES and SHARP[8].

Reversion of the L filaments to cocci occurred in two of the Group A and in the Group D streptococcal strains 24 h after subculture to tryptose agar enriched with sheep blood. No reversion occurred for the other four strains.

The concept that L formation is normal does not contradict the evidence that L forms can be artificially stimulated in media usually devoid of them, when penicillin interrupts cell wall synthesis. It has been shown for Group A streptococci, for instance that the stage induced by penicillin lacks rhamnose and hexosamine[9], constituting an explanation for the lack of rigidity of the wall.

The medium described in this paper has also proved useful for recovering streptococci *in vivo*. A patient with subacute bacterial endocarditis did not respond to heavy dosage of penicillin. Meningitis developed as a complication, with a spinal fluid cell count of 4000/cm³. Repeated cultures of blood and of spinal fluid resulted in no growth. The defined medium was tested, with the agar content lowered to 0.1%. Horse serum (2.0%) was added to enrich

[1] Contribution 67 from the Dept. of Biology, Wayne State Univ. This work received financial support from U.S. Public Health Service Grant E. 921.

[2] L. MATTMAN, L. TUNSTALL, W. MATHEWS, and D. GORDON, Amer. Rev. resp. Dis. (1960).
[3] M. MEDILL and D. O'KANE, J. Bacteriol. *68*, 530 (1954).
[4] L. MATTMAN and K. VAUGHAN, Bacteriol. Proc. P. 35 (1959).
[5] L. MATTMAN, L. TUNSTALL, and H. ROSSMOORE, Manuscript in preparation.
[6] L. MATTMAN, L. TUNSTALL, and J. WILSON, Manuscript in preparation.
[7] C. PANOS and S. BARKULIS, J. Bacteriol. *78*, 247 (1959).
[8] L. DIENES and J. SHARP, J. Bacteriol. *71*, 208 (1956).
[9] J. SHARP, W. HIJMANS, and L. DIENES, J. exp. Med. *105*, 153 (1957).

the spinal fluid culture. In 24 h both cultures contained numerous spheroplasts, a few streptococci and highly pleomorphic cocci. When transferred to blood agar the colonies were predominately tiny and the inhibition zones of antibiotic sensitivity tests were read with a dissecting microscope. The organisms from blood and spinal fluid appeared identical, with only a few typical α-hemolytic colonies on first subculture, but with growth becoming entirely typical after three subcultures. After reversion the organisms exhibited the same growth characteristics as the streptococci from cultures before therapy was instituted.

With present knowledge it cannot be stated whether the streptococcus existed in the patient in the L stage, or whether growth was initiated in the L stage because only a few organisms were in the specimens. It has been shown with other cocci that when the inoculum is minimal growth may be of the L type[5].

VIGOUROUX and HANNOUN[10] have found L forms in blood cultures from streptococcal endocarditis in several instances. They have, furthermore, shown that the streptococcus can assume the L form *in vivo* and has an affinity for red corpuscles. In their opinion, MULÈ's[11] intraerythrocytic bodies of scarlet fever and rheumatic fever probably represent streptococcal L forms. The association of streptococcal L forms with erythrocytes was also observed in our cultures.

Zusammenfassung. Es wird gezeigt, dass die L-Form verschiedener Streptokokken auf einfachem vitaminfreiem Nährboden wachsen kann, dessen genaue Zusammensetzung und Herstellung beschrieben wird. Auf das morphologische Wachstumsverhalten der Streptokokkenkolonnen bei Benutzung der synthetischen Nährböden wird ausführlich eingegangen.

L. H. TUNSTALL and L. H. MATTMAN

Graduate School, Wayne State University, Detroit (Michigan), November 21, 1960.

[10] J. VIGOUROUX and C. HANNOUN. Commune 1er Congrès Intern. Path. Infect. Lyon (1956).
[11] F. MULÈ, Exper. *10*, 205 (1954).

DISPUTANDUM

De l'opportunité de quelques équations différentielles en vestibulométrie

C'est à juste titre que le labyrinthe a été ainsi dénommé par les anatomistes d'autrefois. Les physiologistes après eux en ont cherché le fil d'Ariane: ils s'accordent tous à reconnaître les difficultés auxquelles ils se heurtent au cours d'une telle recherche. Aussi, est-ce avec une certaine stupéfaction qu'on a vu les physiciens se mêler d'un problème déjà si complexe et dont les éléments expérimentaux reproductibles sont si peu nombreux; cette carence de données valables explique sans doute la propension que les disciples de DESCARTES ont manifesté à l'égard de l'analogie.

C'est en effet sous la forme d'une séduisante analogie physico-mathématique qu'un théoricien hollandais[1] a présenté le fonctionnement de la cupule labyrinthique, il y a quelques années. Cette analogie n'avait en elle-même rien de répréhensible – car chacun peut comparer la cupule à un pendule de torsion et relever dans un traité de physique classique les fondements mathématiques justificatifs de sa comparaison. Néanmoins, à la lumière des travaux[2–4] qui permettent de voir *in vivo* le «déplacement» cupulaire au cours des différents mouvements de l'animal, on hésite d'emblée à considérer la cupule comme un *pendule* répondant à l'équation:

$$\theta\xi' + \pi\xi'' + \Delta\xi''' = 0$$

(où θ représente le moment d'inertie de la cupule, où π représente le moment de friction/unité de vit. angul., où Δ représente le moment directionnel/unité d'angle, où les trois facteurs ξ représentent respectivement la déviation, la vitesse et l'accélération angulaires de l'endolymphe relativement à celles du crâne).

Il y a à cela deux raisons: la première est qu'il est actuellement impossible de mesurer chez l'homme *d'une manière directement reproductible* les trois constantes et les trois facteurs ci-dessus. Cette raison suffirait à elle seule à rayer définitivement du monde des ingénieuses constructions une telle équation différentielle;

la seconde raison est fournie par le fait que les données les plus classiques[5,6] aussi bien que les plus récentes[7] d'histo-physiologie sensorielle s'accordent à mettre en évidence des phénomènes non linéaires ou mieux, non linéairement amortis dans le temps; l'un des arguments les plus péremptoires réside dans le fait que l'anisotropie de la cupule lui confère des propriétés mécaniques différentes selon les directions.

L'équation de GROEN se trouve ainsi réduite à demeurer à la rigueur une *équation d'état*, sans applicabilité, par conséquent, pour le chercheur ou pour le clinicien, l'un et l'autre devant admettre a priori ce postulat restreint.

Les labyrinthologistes hollandais pourtant, sous l'impulsion de l'école d'Utrecht, ont décidé d'ériger le postulat en loi quasi-générale, l'hypothèse de travail en preuve: le fruit de cette transformation a reçu le nom de cupulométrie[8,9]. Il apparaît pourtant à un esprit scientifique rigoureux qu'un tel sophisme ne devrait pas être possible à notre époque; il semble surtout qu'un tel artifice ne devrait pas permettre la mise en doute des principes physiologiques les plus appuyés par une longue expérience, telle les lois d'EWALD et de BARANY (connue sous le nom de 2e loi d'EWALD)[10,11], la valeur du seuil nystagmique

[1] A. A. J. VAN EGMOND, J. J. GROEN et L. B. W. JONGKEES, J. Physiol. *110*, 1 (1949).
[2] G. DOHLMAN, Proc. Roy. Soc. Med. *28*, 65 (1935).
[3] W. STEINHAUSEN, Z. Laryng. Rhinol. *26*, 29 (1933).
[4] A. LEDOUX, Acta oto-laryng. Belg. *12*, 113 (1958).
[5] CL. F. WERNER, Z. Zellforsch. *25*, 341 (1937).
[6] G. COASSOLO, Arch. Ital. O. R. L., Suppl. *17* (1954).
[7] J. WERSÄLL, Acta oto-laryng., Suppl. *126* (1956).
[8] A. A. J. VAN EGMOND, J. J. GROEN et L. B. W. JONGKEES, J. Laryng. Otol. *63*, 299 (1949).
[9] J. EK, L. B. W. JONGKEES et A. J. KLIYN, Acta oto-laryng. *51*, 416 (1960).
[10] J. R. EWALD, *Physiologische Untersuchungen über das Endorgan des Nervus octavus Bergmann* (Wiesbaden 1892).
[11] R. BARANY, *Physiologie und Pathologie des Bogengang-Apparates beim Menschen* (Deuticke, Leipzig 1907).

d'accélération giratoire définie par l'Ecole de Genève[12–14] ou encore la nature des mécanismes stimulatoires adéquats[15].

Mais, comme chacun le sait, la critique est vaine si elle n'est pas suivie d'une réaction constructive. Nous avons cherché dans cet esprit à donner au «mouvement» cupulaire une relation générale tirée de l'expérience statistiquement contrôlée et dont les paramètres soient rigoureusement mesurables. Il nous a paru en effet important de souligner la concordance mathématique existant entre la cochlée et le vestibule. Dans un travail sur la presbyacousie[16], nous avions réussi à mettre en évidence une relation caractéristique générale de la sensibilité auditive. Cette relation nous paraît exister également d'une manière caractérielle stricte et générale en ce qui concerne la sensibilité vestibulaire.

Partant du fait expérimental que la cupule est orthomorphique pour des valeurs infra-liminaires de l'épreuve giratoire liminaire selon MONTANDON et vérifiant que cet «état de repos» se traduit par une absence de réaction nystagmique sur le tracé électronystagmographique; partant d'autre part du fait expérimental que la fréquence des influx nerveux enregistrés au niveau du nerf vestibulaire est augmenté proportionnellement à la compression de la cupule et par conséquent proportionnellement au stimulus d'accélération giratoire (pour autant que celui-ci ne constitue pas une source de résonnance par suite d'une valeur trop élevée ou irrégulière), nous avons pu déterminer que le métamorphisme cupulaire en fonction du temps pouvait au plus être décrit par une équation différentielle du type:

$$\sum_{k=0}^{n} a_k \frac{d^k y}{dt^k} = 0$$

dont la forme: $y(t) = \sum_{k=1}^{n} A_e {}^{Y_k t}$ permet de déterminer la stabilité ou l'instabilité du système. Cette équation a l'avantage de comporter moins de paramètres individuels (Ak représentant les constantes d'intégration déterminées par les conditions initiales et y_k représentant les racines de l'équation caractéristique de l'équation différentielle).

Ayant fait passer de la sorte une équation statique à l'état dynamique et ouvrant ainsi le chemin aux expérimentateurs afin qu'ils puissent en tirer un parti plus complet et moins analogique, nous espérons avoir modestement contribué à la première phase d'une solution éventuelle et descriptible du système labyrinthique.

Summary. On the basis of wide experience in electronystagmography, the author has attempted to establish a characteristic and general relationship between the cupulo-ampullary system of the labyrinth underlining the mathematical parallelism with the cochlear system. At the same time, some partial physico-mathematical analogies, which were expressed concerning the same subject, are criticized.

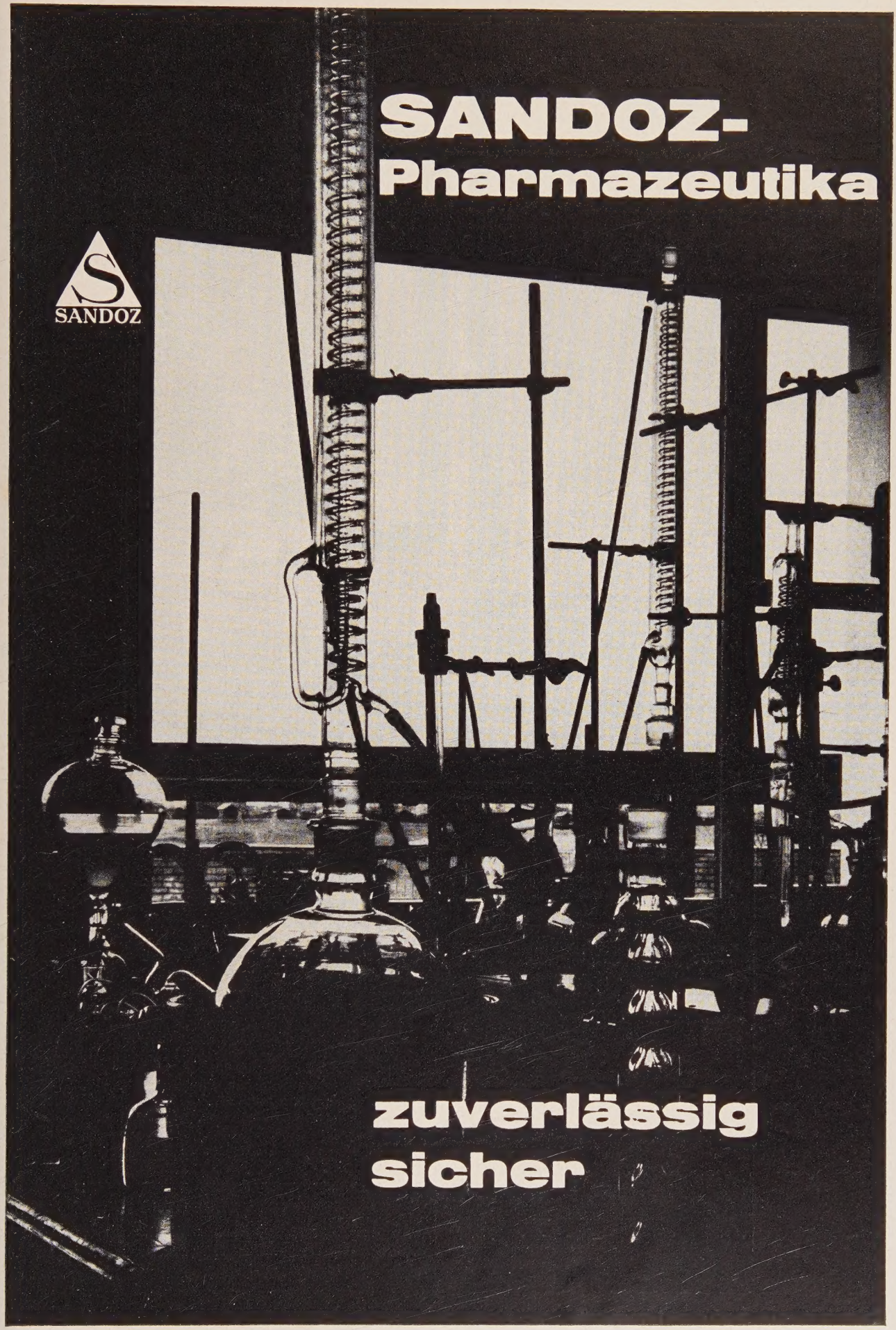
F. DITTRICH

Clinique universitaire d'Oto-rhino-laryngologie, Genève (Suisse), le 6 décembre 1960.

[12] A. MONTANDON, Proc. Collegium oto-rhino-laryng. (London 1954). – Acta oto-laryng. *44*, 594 (1955).
[13] A. MONTANDON et A. RUSSBACH, Pract. oto-rhino-laryng. *17*, 224 (1955). – Acta oto-laryng. *46*, 264 (1956).
[14] A. MONTANDON et J. FUMEAUX, Pract. oto-rhino-laryng. *19*, 556 (1957).
[15] A. MONTANDON et F. DITTRICH, a paraître dans Acta oto-laryng. Belg.
[16] J. FUMEAUX, *La presbyacousie*, à paraître.

CORRIGENDUM

F. GROSS: *Renal and Extrarenal Actions of Aldosterone.* Exper. vol. XVII, fasc. 2, p. 63 (1961). Die Bilder zu den Legenden Fig. 6 und 7 sind vertauscht.


SANDOZ-
Pharmazeutika
SANDOZ
zuverlässig
sicher

WE NEVER
SAY "NO"

WE SHIP YOUR
ORDER TODAY
(Air Mail or Parcel Post, as you wish)

18,000
CHEMICALS FOR
IMMEDIATE DELIVERY
FROM STOCK.
LARGEST VARIETY
ANYWHERE

Ask for our new catalogue

BIOS *Laboratories, Inc.*
17 West 60th St., New York City 23, U.S.A.
Kabeladresse: BIOSLAB

Pathologist

Pfizer Ltd. wishes to appoint a Pathologist in its Pharmacological Research Department at Sandwich in Kent. The person appointed will be concerned with research into the pathology of a variety of non-infectious diseases and infections in laboratory animals, and with the pathological evaluation of drug action during and after toxicological trials. In addition, the Pathologist will be encouraged to conduct research into subjects of his own choosing.

Applicants should have medical or veterinary qualifications; experience of histo-chemical techniques will be an asset.

Working conditions and terms of employment at Pfizer are very good, and staff have a choice of residence in coastal and inland East Kent towns.

Please send full details of yourself to the

PERSONNEL OFFICER (RESEARCH), PFIZER LTD.
SANDWICH (KENT.)

THE Pfizer GROUP
CHEMICALS · PHARMACEUTICALS · VACCINES
AGRICULTURAL & VETERINARY PRODUCTS

REGIS BIOCHEMICALS

KYNURAMINE DIHYDROBROMIDE
New substrate for a more sensitive, accurate, rapid assay of monamine oxidase.

HOMOCARNOSINE
(gamma-Aminobutyryl-L-histidine Sulfate).
Recently reported peptide useful in central nervous system studies.

MELATONIN
(N-Acetyl-5-methoxytryptamine)
Newly isolated hormone with melanocyte lightening activity.

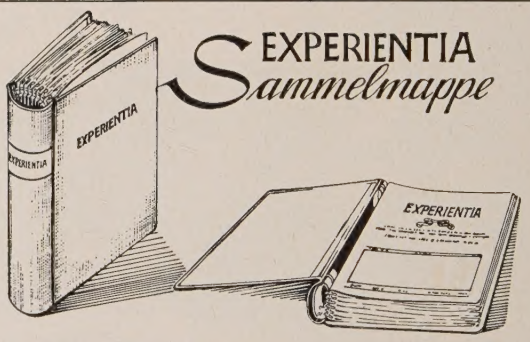
DL 5-HYDROXY-TRYPTOPHAN
Metabolic precursor to Serotonin.

5-HYDROXY-3-INDOLE-ACETIC ACID
Metabolite of Serotonin.

Write for complete listing of chemicals.

REGIS CHEMICAL COMPANY
1219 N. Wells Street, Chicago 10, Illinois USA

EXPERIENTIA *Sammelmappe*



Diese Mappe hat den Zweck, die Hefte des laufenden Jahrganges zusammenzuhalten, bevor der komplette Jahrgang gebunden werden kann. Die einzelnen Hefte können mittels einer neuartigen patentierten Haltevorrichtung in die Mappe eingeheftet und im Bedarfsfall wieder herausgelöst werden. Mit dieser geschmackvoll in Kunstleder gebundenen Mappe soll dem Übelstand abgeholfen werden, dass einzelne Hefte im Laufe des Jahres verlorengehen und vor dem Einbinden nachbezogen werden müssen. Die Sammelmappe ist so massiv konstruiert, daß sie ihren Dienst auf Jahre hinaus leisten wird.

Preis in Kunstleder gebunden: Fr. 6.75

— — — — — — — — — — — — —

BESTELLSCHEIN

An den BIRKHÄUSER VERLAG, BASEL 10 (Schweiz)
Ich bestelle... Sammelmappe(n) zum Preise von Fr. 6.75

Name: Vorname:

Ort: Strasse:

Bitte in Blockschrift schreiben